



Rubens de Paula Junior

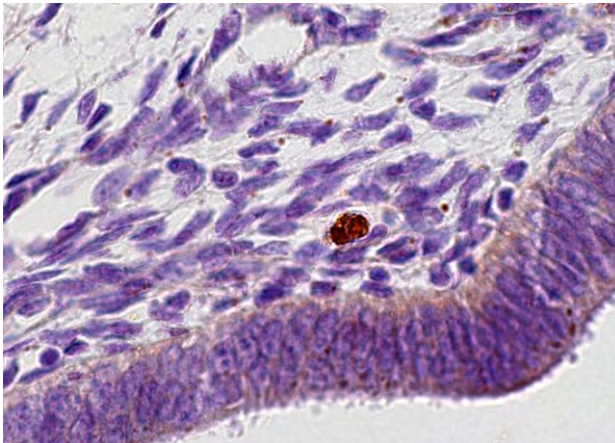
**Análise das células inflamatórias e expressão da proteína anti-inflamatória
anexina A1 em pacientes com endometriose**

Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestrado
em Genética.

São José do Rio Preto, SP.

Rubens de Paula Junior

**Análise das células inflamatórias e expressão da proteína anti-inflamatória
anexina A1 em pacientes com endometriose**



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista – UNESP de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Damas Gil

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Maria Oliani

Paula Junior, Rubens.

Análises das células inflamatórias e da proteína anti-inflamatória anexina A1 em pacientes com endometriose / Rubens de Paula Junior. – São José do Rio Preto: [s.n.], 2013.

f. : il. , 30 cm.

Orientador: Cristiane Damas Gil

Coorientador: Sonia Maria Oliani

Tese (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Bioquímica. 2. Anexina – Mecanismo de ação (Bioquímica). 3. Inflamação. 4. Endometriose. 5. Mastócitos. I. Gil, Cristiane Damas. II. Oliani, Sonia Maria. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 577.112

RUBENS DE PAULA JUNIOR

Análise das células inflamatórias e expressão da proteína anti-inflamatória anexina A1 em pacientes com endometriose

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista – UNESP de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

- 1) Prof^a. Dr^a. Cristiane Damas Gil (orientadora), Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP/EPM, São Paulo, SP.
- 2) Prof^a. Dr^a. Eloísa Amália Vieira Ferro, Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, MG.
- 3) Prof. Dr. Newton Antonio Bordin Jr, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, São José do Rio Preto, SP.

São José do Rio Preto, SP.
2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Rubens e Gilda, responsáveis por toda minha força física e perseverança e por impulsionarem meus passos com amor e dedicação eternos, fundamentais no desenvolvimento do meu Mestrado.

À Profª. Drª. Cristiane Damas Gil pelos ensinamentos, confiança, dedicação, paciência, compreensão. Dedico todo meu respeito e admiração, tornando-se peça fundamental no meu desenvolvimento como ser humano.

À Profª. Drª. Sonia Maria Oliani, exemplo de pesquisadora brilhante e incomparável. Agradeço a oportunidade única de poder aprender e trabalhar ao seu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-Ibilce da Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” Campus de São José do Rio Preto, pela recepção.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética pelo apoio e auxílio financeiro, prestados durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado concedida.

Aos Professores colaboradores da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-Famerp, Dr .Antonio Helio Oliani e Dr^a. Denise Cristina Mos Vaz, do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, e também à Dr^a. Solange Garcia Pires D’ávila do Departamento de Patologia e Medicina Forense, pela contribuição fundamental e preciosa na realização do trabalho.

Agradeço às pacientes atendidas no Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FAMERP, que gentilmente autorizaram o uso das biópsias.

Aos colegas do Ibilce e do Laboratório de Imunomorfologia, Aline Miranda, Ayla Blanco, Ana Paula Girol, Carla Molina, Caroline Zanon, Camila Leonel, Cláudia de Mello Gabriela Bueno, Janesly Prates, Jéssica Lacerda, Juliana Lopes, Kallyne Mimura, Livia Ferreira, Marina de Paula, Marystela Fávero, Marcela Proença, Maysa Succi, Natália Cândido, etc.

Em especial, agradeço aos amigos Alexandre Dantas, Analice Andreoli, Laila Cardin, Nathália Sonehara e Thaís Gastardelo, pelo valioso companheirismo, compreensão, incentivo e amizade.

Em especial também, agradeço ao Poatan Pinoti, companheiro de trabalho, pelo auxílio e aprendizagem mútuos.

Ao meu irmão Rafael Ferreira de Paula, pelo amor, proteção e companheirismo sempre, e à minha avó Jerônima, que ora com fervor por minhas realizações.

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o Céu, enquanto as cheias as baixam para a terra, sua mãe.”

Leonardo Da Vinci

RESUMO

A endometriose é uma doença inflamatória crônica, de etiologia multifatorial caracterizada pela implantação e crescimento do endométrio fora da cavidade uterina (endométrio ectópico). Nas lesões de endometriose, os mastócitos aparecem em elevado número, no entanto, poucos estudos investigaram seus mediadores inflamatórios na patogênese dessa doença. Entre os mediadores dos mastócitos ressaltamos a anexina A1 (ANXA1), proteína de 37 kDa com múltiplas ações biológicas como inibição da transmigração de leucócitos, proliferação celular e apoptose. Tais efeitos são mediados por receptores para peptídeos formilados (FPRs), especialmente FPR1. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar o papel das células inflamatórias, particularmente a ativação e heterogeneidade dos mastócitos, sua correlação com a expressão e o mecanismo de ação da ANXA1 em biópsias de endométrios eutópicos (controle, n=10) e ectópicos (endometriose de parede abdominal, n=18). As amostras de endométrio ectópico foram coletadas entre julho de 2003 e janeiro de 2012, incluídas em parafina e cedidas pelo Departamento de Patologia da FAMERP. As biópsias de endométrios eutópicos foram coletadas de pacientes sem quadro clínico de endometriose, entre junho de 2011 e junho de 2012, com a colaboração do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FAMERP. Essas biópsias foram processadas para: (i) análises histopatológicas, (ii) quantificação de células inflamatórias (neutrófilos e mastócitos) e (iii) imuno-histoquímica utilizando anticorpos específicos para estudo da heterogeneidade dos mastócitos (triptase e quimase), da expressão da ANXA1 e do receptor FPR1 nos tecidos. A análise histopatológica das lesões de endometriose mostrou dois padrões morfológicos: glandular misto (presença de glândulas diferenciadas com epitélio simples prismático e, indiferenciadas com epitélio simples cúbico ou pavimentoso) e glandular indiferenciado, ambos associados com influxo significativo de neutrófilos ($P < 0.0001$) e mastócitos ativados ($P < 0.0001$) em comparação com os endométrios eutópicos. O desenvolvimento das lesões também foi associado a uma alteração da heterogeneidade dos mastócitos com aumento significativo no número de células quimase-

positivas nos endométrios ectópicos, assim como seus níveis endógenos, comparados aos eutópicos. Não foi observada diferença no número de mastócitos triptase-positivos entre as amostras eutópicas e ectópicas. A imuno-histoquímica revelou a expressão da proteína ANXA1 nas células inflamatórias, sobretudo mastócitos, neutrófilos, células estromais, endotélio e células epiteliais glandulares. Nas lesões ectópicas, os níveis endógenos de ANXA1 e do seu receptor FPR1 aumentaram significativamente nas células epiteliais das glândulas indiferenciadas em relação às células do endométrio eutópico, mostrado pela análise densitométrica. Em conclusão, o aumento nos níveis de expressão da quimase nos mastócitos e da ANXA1 e FPR1 no epitélio dos endométrios ectópicos evidenciam sua participação na patogênese da endometriose como importantes alvos terapêuticos.

Palavras-chave: endometrioma, inflamação, heterogeneidade dos mastócitos, lipocortina 1, receptor FPR1, quimase.

ABSTRACT

Endometriosis is a chronic inflammatory disease of multifactorial etiology, characterized by implantation and growth of endometrium outside the uterine cavity (ectopic endometrium). Endometriotic lesions presented a high number of mast cells, however, few studies have investigated their inflammatory mediators in the pathogenesis of this disease. Among these mediators we emphasize annexin A1 (ANXA1), a 37 kDa protein with multiple biological actions like inhibition of leukocyte transmigration, cellular proliferation and apoptosis. Such effects are mediated by formyl peptide receptors (FPRs), especially FPR1. Thus, the purpose of this study was to investigate the role of inflammatory cells, particularly the activation and heterogeneity of mast cells, and its correlation with expression and mechanism of action of ANXA1 in biopsies of eutopic (control, n = 10) and ectopic endometrium (abdominal wall endometriosis; n = 18). The samples of ectopic endometrium were collected between July 2003 and January 2012, embedded in paraffin and provided by the Department of Pathology of FAMERP. Biopsies of eutopic endometrium were collected from patients without clinical features of endometriosis, between June 2011 and June 2012, with the contribution of the Department of Obstetrics and Gynecology of FAMERP. These biopsies were processed for: (i) histopathology, (ii) the quantification of inflammatory cells (neutrophils and mast cells) and (iii) immunohistochemistry using specific antibodies to study the heterogeneity of mast cells (chymase and tryptase), and expression of ANXA1 and FPR1 receptor in tissues. Histopathological analysis of endometriotic lesions showed two morphological patterns: glandular pattern of mixed differentiation (presence of differentiated glands with simple prismatic epithelium and undifferentiated glands with simple squamous or cubic epithelium) and undifferentiated, both associated with a significant influx of neutrophils ($P < 0.0001$) and activated mast cells ($P < 0.0001$) compared to eutopic samples. Development of lesions was also associated with a change in mast cell heterogeneity showing a significant increase in the number of chymase-positive cells, as well as their endogenous levels of expression. There was no difference in the number of tryptase-positive

mast cells between eutopic and ectopic samples. Immunohistochemistry revealed the expression of ANXA1 protein in inflammatory cells, particularly mast cells, neutrophils, stromal cells, endothelial cells and gland epithelial cells. In ectopic lesions, endogenous levels of ANXA1 and its FPR1 receptor are significantly upregulated in the epithelial cells of undifferentiated glands compared to glands of eutopic endometrium, shown by densitometric analysis. In conclusion, increased expression levels of chymase in the mast cells and ANXA1 and FPR1 in the epithelium of ectopic endometrium show their participation in the pathogenesis of endometriosis as important therapeutic targets.

Keywords: endometrioma, inflammation, mast cell heterogeneity, lipocortin 1, FPR1 receptor, chymase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenvolvimento e distribuição dos mastócitos.....	19
Figura 2	Proteína anti-inflamatória anexina A1.....	21
Figura 3	Ações biológicas da ANXA1.....	23
Figura 4	Análise histopatológica de endométrios eutópicos e ectópicos.....	34
Figura 5	Presença de células inflamatórias nos endométrios eutópicos e ectópicos.....	36
Figura 6	Mastócitos na mucosa uterina.....	37
Figura 7	Análise da heterogeneidade dos mastócitos.....	39
Figura 8	Expressão da proteína ANXA1 nos endométrios eutópico e ectópico.	41
Figura 9	Expressão da ANXA1 em mastócitos no endométrio ectópico.....	42
Figura 10	Expressão da proteína ANXA1 nas células epiteliais glandulares endometriais.....	43
Figura 11	Expressão do receptor FPR1 da proteína ANXA1 nas células epiteliais glandulares endometriais	45
Figura 12	Hipótese dos mecanismos de ação da quimase e ANXA1 na endometriose de parede abdominal.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
°C	Graus Celsius
ANOVA	Análise de variância
ANXA1	Proteína anexina A1
Ac2-26	Peptídeo derivado da região N-terminal da ANXA1
CTMC	Mastócito de tecido conjuntivo
Ca²⁺	Íon cálcio
COX-2	Ciclooxigenase-2
EGFR	Receptor para fator de crescimento epidérmico
fMLF	Peptídeo N-formil-metionil-fenilalanina
FPRs	Receptores para peptídeos formilados
FPR1	Receptor para peptídeo formilado 1
FPR2/ALX	Receptor para peptídeo formilado 2 / receptor para lipoxina A4
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
IL	Interleucina
kDa	Quilodalton
LXA4	Lipoxina A4
M	Molar
MMC	Mastócito de mucosa
MC_T	Mastócito que expressa somente triptase
MC_{TC}	Mastócito que expressa triptase e quimase
MMP	Metaloproteinases
nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato salina

PGs	Prostaglandinas
PLA₂	Fosfolipase A ₂
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SCF	Fator de células fonte
S.E.M.	Erro padrão da média
TK	Tirosina quinase
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Mastócitos e endometriose	18
1.2. Anexina A1	20
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Casuística.....	28
3.2. Amostras	28
3.3. Fixação, processamento e inclusão para as microscopias de luz.....	29
3.4. Quantificação das células inflamatórias	30
3.5. Imuno-histoquímica.....	30
3.5.1. <i>Análise da heterogeneidade dos mastócitos</i>	30
3.5.2. <i>Análise da expressão da proteína anexina A1 e do receptor FPR1</i>	31
3.6. Análises estatísticas.....	31
4. RESULTADOS	32
4.1. Avaliação histopatológica.....	33
4.2. Quantificação das células inflamatórias	35
4.3. Análise da heterogeneidade dos mastócitos.....	38
4.4. Expressão da ANXA1 nos endométrios eutópicos e ectópicos	40
4.5. Expressão de FPR1 nos endométrios eutópicos e ectópicos	44
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
8. ANEXOS	65

1. INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença inflamatória crônica, de etiologia multifatorial, caracterizada pela implantação e crescimento de estroma e tecido glandular endometrial funcional em localização extra-uterina, denominado endométrio ectópico (PODGAEC et al., 2007; LI et al., 2008; OZEL et al., 2012, DING et al., 2013). O endométrio ectópico é histologicamente semelhante ao endométrio normal (eutópico) de mulheres sem endometriose e de mulheres afetadas pela doença. Ambos são constituídos por epitélio de revestimento simples cilíndrico, associado a glândulas endometriais tubulares simples, e uma lâmina própria denominada estroma endometrial. No entanto, tais tecidos eutópicos e ectópicos diferem entre si bioquímica e funcionalmente em numerosas vias, incluindo receptividade a esteroides, potencial proliferativo e invasivo (PODGAEC et al., 2007; MAYBIN; CRITCHLEY; JABBOUR, 2011; ALGOULEA et al., 2012; MUNKSGAARD & BLAAKAER, 2012).

O local mais comum de implantes do endométrio é na cavidade pélvica, mas podem também ser encontrados nos ovários e septo reto-vaginal e, ocasionalmente, no pericárdio, pleura, fígado, rim, bexiga e cérebro (GIUDICE & KAO, 2004; JIANG & WU, 2012). Na parede abdominal ou nos ovários, esses implantes podem sofrer alta proliferação originando um tumor benigno denominado endometrioma (ACCETTA et al., 2011; OZEL et al., 2012). Ainda, implantes ectópicos podem se desenvolver no próprio útero, atingindo o miométrio e originando uma endometriose interna ou adeniose (GIUDICE & KAO, 2004; ACCETTA et al., 2011; JIANG & WU, 2012; MACCAGNANO et al., 2012; OZEL et al., 2012).

Embora existam muitas pesquisas envolvendo a endometriose, a sua causa é desconhecida e a etiologia multifatorial, incluindo as seguintes teorias (WU et al., 2007; TENG et al., 2008; PAŞALEGA et al., 2011; AUGOULEA et al., 2012; BIANCO et al., 2012; MACCAGNANO et al., 2012):

- i. Metaplasia das células mesoteliais pleurais e peritoneais que se tornam células glandulares endometriais. Essa teoria não explica a ocorrência da endometriose intrapulmonar ou predominância da doença no lado direito.

- ii. Refluxo de fragmentos endometriais viáveis por meio das tubas uterinas durante a menstruação, ocasionando sua implantação na superfície peritoneal ou em outros órgãos pélvicos. Considerando que a menstruação retrógrada ocorra em 76-90% das mulheres e a prevalência da doença é inferior a esses números, provavelmente outros mecanismos estão envolvidos na viabilidade dos implantes (item v).
- iii. Transplante de fragmentos endometriais por meio de embolia linfática ou vascular para locais fora da cavidade peritoneal, tais como pele, pulmão, rins. Trauma ou manipulação do útero são fatores que predispõem à formação de microembolias.
- iv. Teoria iatrogênica, na qual a implantação de focos de endometriose ocorre por cirurgias via abdominal, tais como cesariana e histerectomia. O endométrio é diretamente inoculado na ferida cirúrgica, permanecendo células endometriais viáveis, que proliferam sob estímulo hormonal.
- v. Fatores genéticos, imunológicos, hormonais, anatômicos e ambientais.

A endometriose pode ser considerada um problema de saúde pública, pois representa uma das desordens ginecológicas mais comuns, afetando 10 a 20% das mulheres em idade reprodutiva, e mais de 30% de mulheres com infertilidade. Além disso, a prevalência da endometriose associada à infertilidade feminina é de 62%, em adolescentes com dismenorreia de difícil tratamento de 50% e em mulheres assintomáticas, de 2 a 22% (CRAMER & MISSMER, 2002; AUGOULEA et al., 2012).

Alguns sintomas são característicos dessa doença e estão diretamente relacionados com a qualidade de vida das pacientes, tais como a dismenorreia, dispneúria, dor pélvica não cíclica e infertilidade (POLINESS et al., 2004; KHOUFACHE et al., 2012). Evidências sugerem que esses sintomas resultam de uma reação inflamatória pélvica crônica, ocasionada pelos implantes endometriais ectópicos que sofrem sangramento cíclico e, assim, liberam mediadores e promovem recrutamento celular local (LEBOVIC; MUELLER; TAYLOR, 2001; KHOUFACHE et al., 2012).

Existe uma relação direta entre a severidade da dismenorreia e produção de prostaglandinas (PGs) nos tecidos ectópicos na endometriose (KOIKE et al., 1992; ANAF et

al., 2006; BROWN; KIVES, AKHTAR, 2012). As terapias atuais para o tratamento da endometriose incluem contraceptivos combinados orais, progestinas e drogas não esteroides anti-inflamatórias. A maioria das drogas tem como alvo os níveis de PGs e, portanto, reduzem as dores associadas à doença (CROSIGNANI et al., 2006; STREULI et al., 2012; BROWN; KIVES; AKHTAR, 2012; RÖMER, 2012). No entanto, nenhum tratamento efetivo foi desenvolvido até o momento para curar ou prevenir a recorrência da endometriose.

1.1. Mastócitos e endometriose

Uma das células que atuam como fonte de PGs para o tecido são os mastócitos, células residentes do tecido conjuntivo e caracterizadas pela presença de inúmeros grânulos citoplasmáticos contendo potentes mediadores farmacológicos. Os mastócitos derivam de células pluripotentes da medula óssea, que migram para os tecidos e se diferenciam em células maduras pela influência de diversos fatores e citocinas específicas (GALLI; GRIMBALDESTON; TSAI, 2008; DYDUCH; KACZMARCZYK; OKON, 2012; ZHANG & SHI, 2012).

Os precursores dos mastócitos migram da circulação para os tecidos periféricos, onde se relacionam intimamente com vasos sanguíneos e linfáticos, nervos periféricos e superfícies epiteliais (GALLI; GRIMBALDESTON; TSAI, 2008). Nesses locais, sob a influência do fator de células fonte (SCF) e outras citocinas localmente produzidas como interleucina-3 (IL-3), IL-4, IL-9 e IL-10, expressam o fenótipo final, ou seja, mastócitos de tecido conjuntivo (CTMC) ou de mucosa (MC), assim denominados em roedores (GALLI; GRIMBALDESTON; TSAI, 2008; GURISH & AUSTEN, 2012), e mostrados na Figura 1.

Em humanos, a heterogeneidade dos mastócitos é baseada em dois subtipos, classificados pelas serina proteinases estocadas em seus grânulos citoplasmáticos: mastócitos que contêm triptase/quimase (MC_{TC}) ou somente triptase (MC_T) (PEJLER et al., 2012).

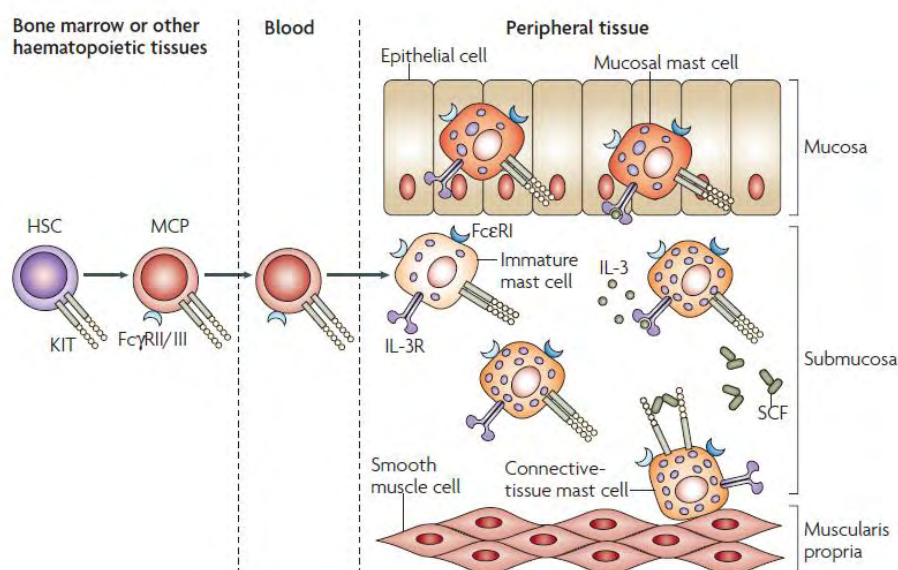


Figura 1 – **Desenvolvimento e distribuição dos mastócitos.** Os progenitores de mastócitos (MCP) circulam livremente no sangue e vão para o tecido onde sofrem diferenciação e maturação. O fenótipo final dos mastócitos é dependente de fatores de crescimento presentes no tecido. Por exemplo, os mastócitos de mucosa são encontrados na mucosa do intestino, enquanto os mastócitos de tecido conjuntivo residem nas camadas submucosa e muscular. Fator de célula fonte (SCF). Figura retirada de Galli; Grimaldeston; Tsai, 2008.

A localização dos mastócitos ocorre, frequentemente, em áreas expostas ao ambiente externo, como a pele e as mucosas dos sistemas respiratório, digestório e urogenital, em órgãos linfoides secundários, no tecido conjuntivo associado ao sistema nervoso central e, usualmente essas células são localizadas próximas aos vasos sanguíneos e nervos periféricos (STEAD et al., 2006; DE VRIES et al., 2009; DYDUCH; KACZMARCZYK; OKON, 2012; ZHANG & SHI, 2012). Os mastócitos apresentam potentes mediadores bioativos pré-estocados em seus grânulos citoplasmáticos, tais como histamina, heparina, triptase e quimase, capazes de potencializar a migração e a proliferação celular, induzir a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e, conseqüentemente, ativar o processo de angiogênese e proliferação celular (YANO et al., 1999; OZDEMIR, 2006; DYDUCH; KACZMARCZYK; OKON, 2012; ZHANG & SHI). Além disso, os mastócitos, uma vez ativados, sintetizam mediadores, tais como PGs e leucotrienos, que potencializam os efeitos dos já liberados, prolongando sua ação no tecido.

A relação entre os mastócitos e a endometriose tem sido relatada na literatura, mostrando elevado número dessas células nas lesões (IHARA; UCHIIDE; SUGAMATA, 2004; KEMPURAJ et al., 2004; MENZIES et al., 2011), e frequentemente localizadas próximas de fibras nervosas (ANAF et al., 2006). A alta densidade de mastócitos e a expressão fortemente positiva para o hormônio liberador de corticotropina, urocortina e outras proteases específicas de mastócitos, nos locais de endometriose, sugerem essas células como fortes candidatas na indução da inflamação e fibrose na doença (KEMPURAJ et al., 2004; DIACONU et al., 2011; OSUGA et al., 2012).

Embora existam dados mostrando a ligação dos mastócitos com a patogênese da endometriose, poucos estudos investigaram os mediadores envolvidos no processo. Sabe-se que o refluxo retrógrado de fragmentos endometriais na cavidade pélvica pode induzir resposta inflamatória e consequente recrutamento dos leucócitos da circulação sanguínea para o ambiente peritoneal (MAYBIN; CRITCHLEY; JABOUR, 2010; KHOUFACHE et al., 2012). O mecanismo do recrutamento é desencadeado por uma série de mediadores pró-inflamatórios, produzidos por células, como mastócitos, macrófagos, células endoteliais ativadas, assim como leucócitos transmigrados para o tecido inflamado (NOURSHARGH; HORDIJK; SIXT, 2010; KAPONIS et al., 2012; KHOUFACHE et al., 2012). Por outro lado, a resposta inflamatória é controlada pela ação de mediadores anti-inflamatórios, que atuam para manter a homeostasia da resposta imunológica e prevenir a lesão tecidual. Entre esses mediadores destacamos a anexina A1 (ANXA1), proteína de 37 kDa, que é expressa pelos mastócitos, e atua como moduladora do processo inflamatório (OLIANI et al., 2000; GIL et al., 2006; OLIANI & GIL, 2006).

1.2. Anexina A1

A anexina A1 (ANXA1) foi o primeiro membro caracterizado de uma superfamília de proteínas que se ligam aos fosfolipídios de uma forma dependente de cálcio (RESCHER & GERKE, 2004). Essa proteína foi inicialmente denominada lipocortina 1 pelo fato de mimetizar a ação anti-inflamatória dos glicocorticoides por meio da inibição da síntese de

eicosanoides e fosfolipase A₂ (PLA₂), afetando dessa forma componentes da reação inflamatória e liberação do ácido araquidônico (FLOWER, 1988; PERRETTI & GAVINS, 2003).

Estruturalmente, as anexinas compreendem dois domínios: uma pequena região N-terminal, variando em comprimento e composição, e um domínio central, região C-terminal, formado por quatro a oito dobras repetidas de uma sequência conservada de 70 a 80 aminoácidos (RESCHER & GERKE, 2004). O domínio N-terminal é específico para cada membro dessa família e interage com os diferentes ligantes dessas proteínas, enquanto a região C-terminal é responsável pela afinidade ao cálcio e consequente ligação aos fosfolipídios. Uma representação esquemática da estrutura primária e o arranjo tridimensional da ANXA1 são mostrados na figura 2.

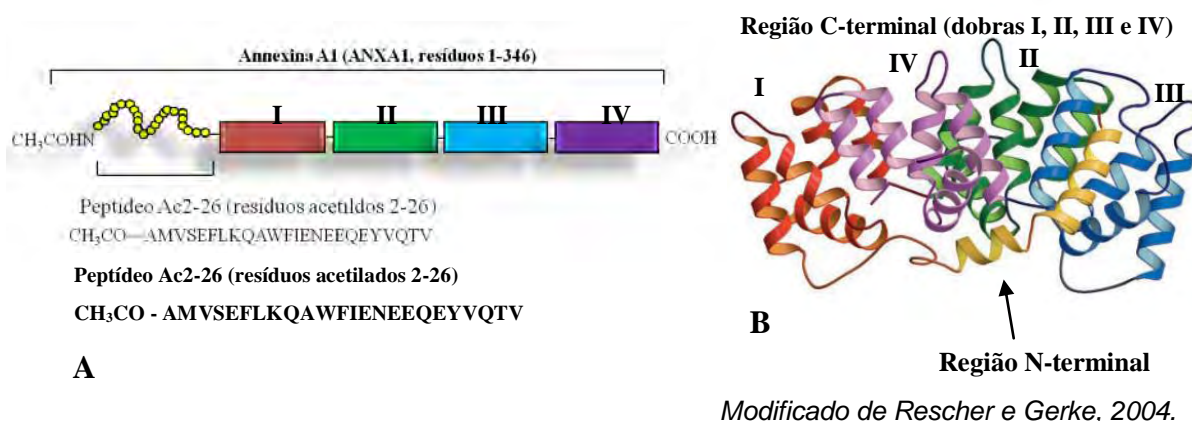


Figura 2 – **Proteína anti-inflamatória anexina A1**. Representação esquemática da estrutura primária [A] da proteína, com destaque do sítio ativo anti-inflamatório (peptídeo Ac2-26), e seu arranjo tridimensional [B].

A ANXA1 é amplamente distribuída no organismo e pode ser encontrada em diversos tipos celulares, como endoteliais, epiteliais dos pulmões, intestinos, estômago, mama, retinas e sinoviócitos (SAMPEY; HUTCHINSON; MORAND, 2000; ALLCOCK et al., 2001; OLIANI et al., 2001; PERRETTI et al., 2001; GIL et al., 2006; PERRETTI & D'ACQUISTO, 2009; ARAUJO et al., 2010) e também em células estromais como fibroblastos (TAGOE et al., 2008). No entanto, a expressão da ANXA1 tem sido observada especialmente em

células relacionadas aos processos de defesa (KAMAL; FLOWER; PERRETTI, 2005) como neutrófilos (OLIANI et al., 2001; GASTARDELO et al., 2009), mastócitos (OLIANI et al., 2008), eosinófilos (OLIANI; DAMAZO; PERRETTI, 2002), monócitos (GOULDING et al., 1990; SOLITO et al., 2001) e linfócitos (D'ACQUISTO et al., 2007; D'ACQUISTO et al., 2008). Essa proteína é particularmente abundante em leucócitos polimorfonucleares, nos quais pode representar cerca de 4% do total de proteínas citosólicas (ERNST et al., 1990).

Pelo fato de exercer múltiplas funções, destacadas na Figura 3, a ANXA1 também pode ser relacionada a várias condições patológicas, como câncer e doenças autoimunes (ROVIEZZO et al., 2002; OLIANI & GIL, 2006; RODRIGUES-LISONI et al., 2006; SILISTINO et al., 2007). No entanto, sua relação com a endometriose tem sido pouco explorada. Um trabalho detectou aumento nos níveis da ANXA1 e do seu RNAm em endométrios eutópicos de vinte e cinco pacientes, principalmente nas células glandulares endometriais (LI et al., 2008). Além disso, o estudo demonstrou a presença da ANXA1, por meio de *Western blotting*, nos fluidos peritoneais de dez pacientes, sugerindo um papel dessa proteína na patogênese da endometriose.

Várias investigações indicam que as ações exercidas pela ANXA1 nos tecidos ou células, podem ser mediadas pelos receptores para peptídeos formilados (FPRs), que pertencem à família de receptores acoplados à proteína G (PERRETTI et al., 2001; GAVINS et al., 2003; ERNST et al., 2004; PERRETTI & DALLI, 2009; DUFTON & PERRETTI, 2010).

Em humanos, apenas três tipos de FPRs foram descritos e incluem FPR1, FPR2/ALX (também conhecido como FPRL-1) e FPR3 (antes designado como FPRL-2) (YE et al., 2009). Ambos FPR2/ALX e FPR3 estão colocalizados com o FPR1 na região cromossômica 19q13.3 (BAO et al., 1992; ALVAREZ et al., 1994). Os receptores *fpr1* e *fpr2* de roedores (antes designados *Fpr-rs1* e *Fprs-rs2*) correspondem, respectivamente, ao FPR1 e FPR2/ALX em humanos, com os quais compartilham homologies de 77 e 76 % (GAO et al., 1998; YE et al., 2009; DUFTON & PERRETTI, 2010).

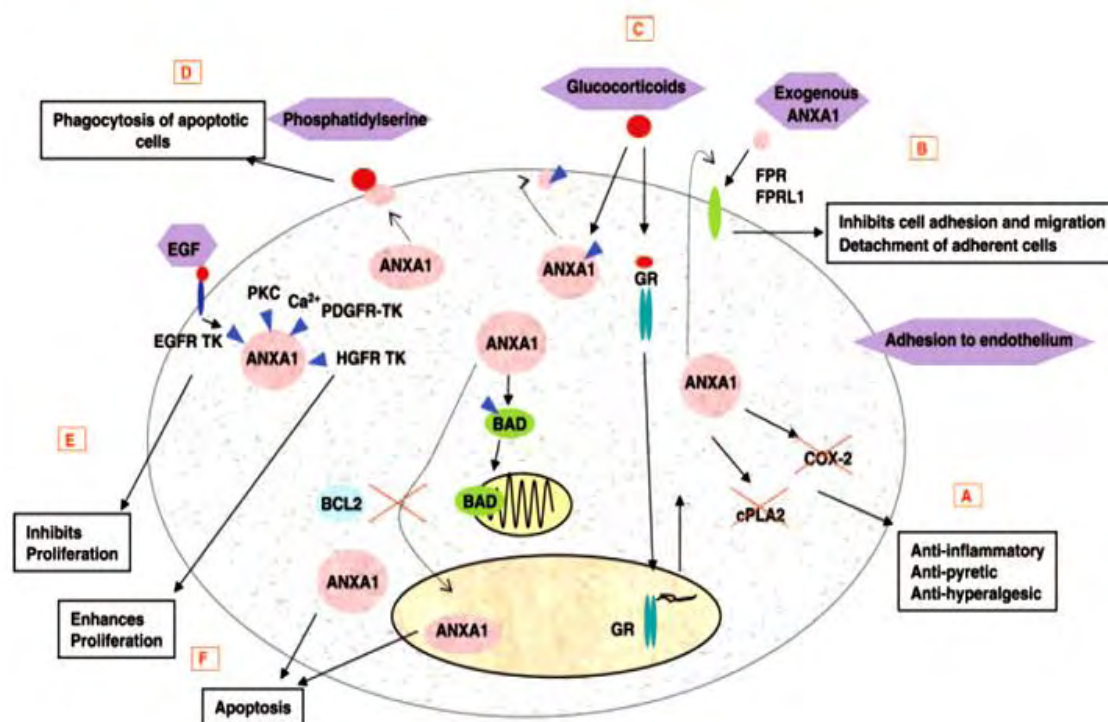


Figura 3. **Ações biológicas da ANXA1.** [A] Inibição da fosfolipase A2 (cPLA₂) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2). [B] Inibição da diapedese leucocitária mediada pelo receptor para peptídeos formilados (FPR). [C] Expressão aumentada da ANXA1 após tratamento com glicocorticoide. [D] Estimulação de fagocitose de células apoptóticas por meio da exposição da fosfatidilserina. [E] Inibição da proliferação celular por meio da fosforilação da tirosina quinase relacionada ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR TK). [F] Indução da apoptose pela superexpressão da ANXA1 e translocação para o núcleo. Figura retirada de Lim e Pervaiz, 2007.

Esses receptores, particularmente o FPR1 e FPR2/ALX, quando se ligam ao seu agonista sofrem alterações na sua conformação permitindo interações funcionais com a proteína G (MIGEOTTE; COMMUNI; PARMENTIER, 2006). Essa interação promove várias cascatas de sinalização que incluem influxo de cálcio (Ca²⁺), fosfolipase A₂, C e D, e ativação de mitógenos (SELVATICI et al., 2006; DUFTON & PERRETTI, 2010).

A expressão dos receptores FPRs foi demonstrada principalmente em células imunes inatas, tais como monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, hepatócitos e fibroblastos (DUFTON & PERRETTI, 2010). No endométrio humano apenas um trabalho relatou a expressão de FPR2/ALX nas células epiteliais e estromais por imuno-histoquímica

(MACDONALD et al., 2011). Ainda, os pesquisadores mostraram, por RT-PCR, modulação positiva desse receptor associada à fase menstrual do ciclo endometrial e primeiro trimestre de gestação, evidenciando um papel do FPR2/ALX na fisiologia do endométrio.

Com essas considerações, os estudos das ações biológicas da ANXA1, particularmente envolvendo sua interação com receptores FPRs, representam um grande avanço sobre os anos de investigações terapêuticas desse mediador anti-inflamatório. Ainda, apesar das evidências da participação de mediadores endógenos liberados pelos mastócitos na endometriose, pouco se sabe sobre seus efeitos locais na mucosa uterina. Portanto, o delineamento de marcadores inflamatórios, que são altamente expressos no endométrio ectópico, pode levar a um melhor desenvolvimento no diagnóstico da doença com significativos benefícios econômicos e na saúde.

2. OBJETIVOS

Em biópsias de endométrios ectópicos (endometriose de parede abdominal) e eutópicos (controle), foram avaliados os seguintes aspectos:

- 1) Grau de diferenciação histológica em implantes ectópicos de endométrio em pacientes portadoras de endometrioma de parede abdominal.
- 2) Quantificação de células inflamatórias, sobretudo neutrófilos e mastócitos.
- 3) Heterogeneidade dos mastócitos por meio da expressão das proteases triptase e quimase, por meio do método de imuno-histoquímica.
- 4) Expressão e localização da proteína anexina A1 e do seu receptor FPR1, por meio de imuno-histoquímica.
- 5) Modulação da expressão das proteases triptase, quimase, anexina A1 e FPR1, por meio de análises densitométricas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As investigações foram desenvolvidas no Laboratório de Imunomorfologia do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP, em colaboração com os Professores Doutores Antônio Hélio Oliani e Denise Cristina Mos Vaz, do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (Prot. nº 101/2011).

3.1. Casuística

Os estudos foram conduzidos em pacientes em idade reprodutiva (20 a 45 anos), que preencheram os seguintes critérios de inclusão: ciclos menstruais regulares e sem história de uso de qualquer tipo de terapia hormonal nos últimos três meses antes da coleta; ausência de doenças auto-imunes, confirmada por anamnese, exame físico e exames laboratoriais quando necessário. As pacientes selecionadas foram divididas em dois grupos: afetado pela endometriose (n = 18) e controle sem quadro clínico ou laparoscópico sugestivo de endometriose (n = 10).

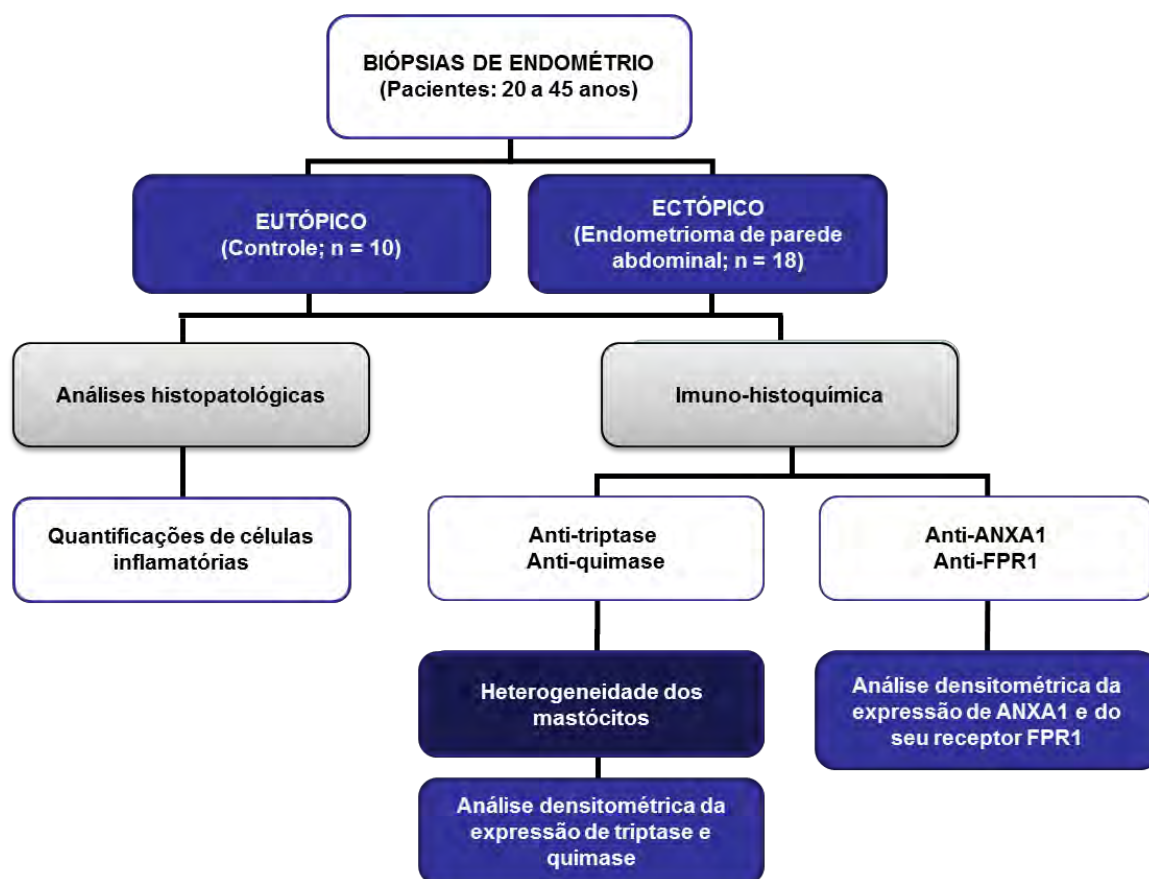
3.2. Amostras

Nas investigações foram utilizadas 18 biópsias de endometriose de parede abdominal (endometrioma), com diagnósticos confirmados pela análise anatomopatológica, coletadas entre julho de 2003 e janeiro de 2012, incluídas em parafina e cedidas pelo Departamento de Patologia da FAMERP, sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Solange Correa Garcia Pires D'Avila.

As pacientes referiam, nos respectivos 18 prontuários médicos analisados, pelo menos um dos seguintes sintomas: dismenorreia (n = 6 - 33%), dispareunia (n = 6 - 33%), dor pélvica crônica (n = 7 - 39%), dor na fossa ilíaca esquerda ou direita com piora no período menstrual (n = 8 - 44%), disúria (n = 2 - 11%), alterações intestinais (n = 2 - 11%). Do total, 15 pacientes (83%) passaram por pelo menos uma cesariana. No exame físico, nove pacientes (50%) apresentaram nodulação palpável na região abdominal.

Para o grupo controle, foram coletadas 10 amostras de endométrio eutópico de pacientes atendidas no Serviço de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FAMERP, com indicação de vídeo-histeroscopia, mas sem quadro clínico, exame físico ou imagem ultrassonográfica sugestivos de endometriose. As amostras foram coletadas na fase proliferativa do ciclo menstrual, entre o 8º e 12º dia, e processadas como descrito no item 3.3., no período de junho de 2011 a julho de 2012. O procedimento cirúrgico foi realizado após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O delineamento experimental foi realizado de acordo com o esquema abaixo.



3.3. Fixação, processamento e inclusão para microscopia de luz

As amostras foram fixadas em formol tamponado 10% por 24 horas, lavadas em água corrente, desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 4µm foram desparafinizados e corados com Hematoxilina-Eosina para avaliação histopatológica e Azul de Toluidina para a quantificação das células inflamatórias.

3.4. Quantificação das células inflamatórias

Nas biópsias, quantificamos os mastócitos com base em suas características morfológicas, intactos e desgranulados, e os neutrófilos, após coloração por Azul de Toluidina a 0,5 %.

A quantificação das células inflamatórias, nos fragmentos endometriais, foi realizada pela observação de 27 campos por secção histológica por paciente, utilizando-se objetiva de 40X no microscópio AXIOSCOP 2 (Zeiss, Germany) do Laboratório de Imunomorfologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP. As áreas de cada tecido foram obtidas com o auxílio do *software* analisador de imagem Axiovision (ZEISS). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão (S.E.M.) do número de células por mm².

3.5. Imuno-histoquímica

3.5.1. Análise da heterogeneidade dos mastócitos

Cortes de 4 μ m obtidos das amostras foram desparafinizados, re-hidratados e a recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato pH 6,0 a 96°C, durante 20 min. As secções foram lavadas em água destilada e a inativação de peroxidases endógenas realizada em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, durante 30 minutos. Após, as secções foram lavadas em tampão fosfato-salina (PBS) e incubados com os anticorpos *mouse monoclonal anti-chymase* (1:100; Abcam, Cambridge, UK) e *goat polyclonal anti-tryptase* (1:200; Novocastra, UK) diluídos em soroalbumina bovina a 2% (BSA), por 16-18 horas, a 4°C, em câmara úmida. Em seguida os cortes foram lavados em PBS, incubados com o anticorpo secundário e complexo avidina-estreptoavidina, por 30 min cada, em câmara úmida (KIT LSAB – Dako) e, revelados pela 3,3'-diaminobenzidina (DAB) de acordo com instruções do fabricante. Os fragmentos foram contracoradas com Hematoxilina de Harris. O controle negativo da reação foi obtido omitindo-se o anticorpo primário.

A quantificação dos mastócitos triptase e quimase-positivos foi realizada em secções seriadas para cada biópsia e de acordo com o descrito no item 3.4.

A modulação da expressão das proteases triptase e quimase nos mastócitos foi realizada por densitometria por meio da análise de 20 células por paciente (n=10 pacientes/grupo) e utilização do programa analisador de imagem Axionvision do microscópio AXIOSKOP 2 (Zeiss) do Laboratório de Imunomorfologia. Os valores foram demonstrados como média \pm S.E.M. de unidades arbitrárias (0 a 255).

3.5.2. Análise da expressão da proteína anexina A1 e do receptor FPR1

Cortes de 4 μ m das biópsias foram utilizados e preparados de acordo com o item 3.5.1. Para detecção da proteína ANXA1 e do receptor FPR1 foram utilizados os anticorpos *polyclonal rabbit* anti-ANXA1 (1:2000; Zymed Laboratories, Cambridge, UK), anticorpo *polyclonal rabbit* anti-FPR1 (1:2000; Abcam Cambridge, UK), diluídos em BSA a 1%, por 16-18 horas, a 4°C.

A análise da expressão da proteína ANXA1 e do receptor FPR1 foi realizada por densitometria em glândulas indiferenciadas e bem diferenciadas (n = 5 para cada padrão glandular por paciente) nos endométrios ectópicos (n = 18) e glândulas endometriais (n = 5) nos eutópicos (n= 10). Para cada glândula foram marcados dez pontos aleatórios nas células epiteliais utilizando programa analisador de imagem Axiovision do microscópio AXIOSKOP 2 (Zeiss), Laboratório de Imunomorfologia. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. de unidade arbitrárias (0 a 255).

3.6. Análises estatísticas

As diferenças estatísticas no número de células e na densidade óptica (unidades arbitrárias) foram determinadas pela análise de variância (ANOVA), seguida quando significativas pelo teste de Bonferroni, e teste *t student*. Os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação histopatológica

Inicialmente, estudamos fragmentos de endométrios eutópicos de dez pacientes sem endometriose (grupo controle), após coloração com Hematoxilina-Eosina. Esses fragmentos são constituídos por estroma (tecido conjuntivo frouxo) e glândulas endometriais tubulosas retas revestidas por epitélio simples cilíndrico (Figuras 4A e B). O padrão glandular nesse tecido confirmou a fase do ciclo menstrual que os fragmentos foram coletados, fase proliferativa. Em algumas biópsias notamos a presença de miométrio, constituído por tecido muscular liso (Figura 4A).

Para o grupo com a doença, analisamos dezoito biópsias de pacientes com endometrioma de parede abdominal, caracterizadas pelo exame anatomopatológico como lesões de cor parda-acastanhada (11 - 61%), creme-amarelada (6 - 34%) ou avermelhada (1 - 5%). A maioria apresentou consistência firme-elástica (13 - 72 %) e com regiões esbranquiçadas (9 - 50%). O tamanho das lesões variou entre 16,0 X 8,0 X 4,5 cm e 1,5 X 1,1 X 1,2 cm de largura X altura X profundidade.

As análises histopatológicas dos tecidos ectópicos demonstraram dois padrões de endometriose glandular de acordo com a classificação morfológica proposta por Abrao et al. (2003): i) glandular misto (n = 11), ou seja presença de epitélios glandulares com padrão diferenciado (epitélio simples cilíndrico) e indiferenciado (epitélio simples pavimentoso ou cúbico) no mesmo fragmento (Figuras 4C e D) e; ii) glandular indiferenciado (n = 7) com presença de espaços glandulares formados por epitélio simples cúbico ou pavimentoso. Essas lesões foram associadas com influxo de células inflamatórias observadas no estroma e na luz das glândulas indiferenciadas (Figura 4C e D) em comparação com endométrios eutópicos (Figuras 4A e B), evidenciando um processo inflamatório associado a essa patologia.

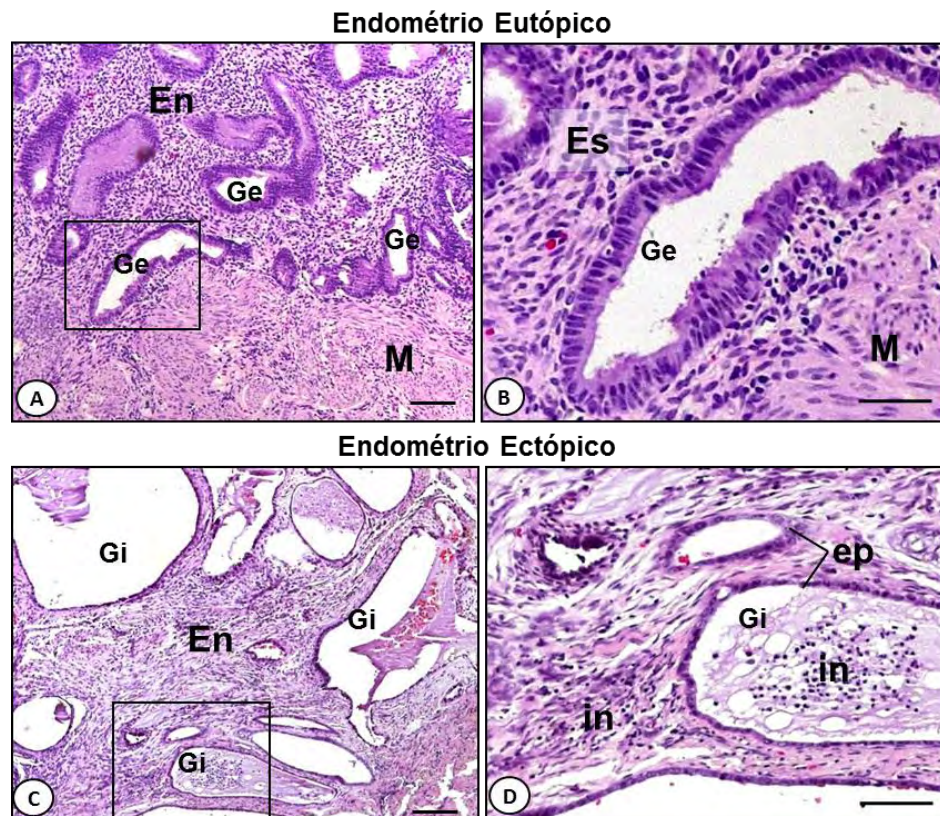


Figura 4. **Análise histopatológica de endométrios eutópico e ectópico.** **[A]** Glândulas endometriais (Ge) em endométrio eutópico (En) na fase proliferativa. **[B]** Detalhe da área retangular da figura anterior mostrando glândula endometrial (Ge), constituída por epitélio simples colunar, e estroma endometrial (Es) formado por tecido conjuntivo frouxo. Miométrio (M). **[C]** Endométrio ectópico (En) com padrão glandular indiferenciado (Gi). **[D]** Maior aumento da área retangular da figura anterior evidenciando infiltrado inflamatório (In) no estroma e na luz da glândula indiferenciada (Gi) mostrando epitélio simples cúbico e pavimentoso (ep). Coloração: Hematoxilina & Eosina. Barras: 100 μ m (A, C) e 20 μ m (B, D).

4.2. Quantificação das células inflamatórias

A quantificação das células inflamatórias foi realizada em secções dos endométrios corados pelo Azul de Toluidina. Nos endométrios ectópicos observamos influxo de células inflamatórias (Figura 5B), sobretudo linfócitos, neutrófilos e mastócitos, em relação aos eutópicos (Figura 5A).

Nas lesões ectópicas, os neutrófilos foram observados na luz das glândulas, particularmente nas de padrão indiferenciado, e transmigrados para o estroma (Figuras 5B-D). A análise quantitativa dessas células confirmou as observações histológicas demonstrando uma alta incidência desse tipo celular nos endométrios ectópicos comparados aos eutópicos (Figura 5E).

A análise dos mastócitos nos endométrios de pacientes controles mostrou a presença de células intactas, contendo grânulos citoplasmáticos metacromáticos após coloração com Azul de Toluidina, localizadas no estroma (Figura 6A) e próximas aos vasos sanguíneos. Nos endométrios ectópicos, notamos uma grande concentração de mastócitos no estroma, muitas vezes em processo de desgranulação (Figura 6B). A quantificação dessas células confirmou as observações histológicas, mostrando aumento significativo no número total de mastócitos nos endométrios ectópicos comparados aos eutópicos (Figura 6C). Ainda, o estudo morfológico dos mastócitos mostrou aumento significativo no número de células íntegras e desgranuladas em relação ao grupo controle (Figura 6D).

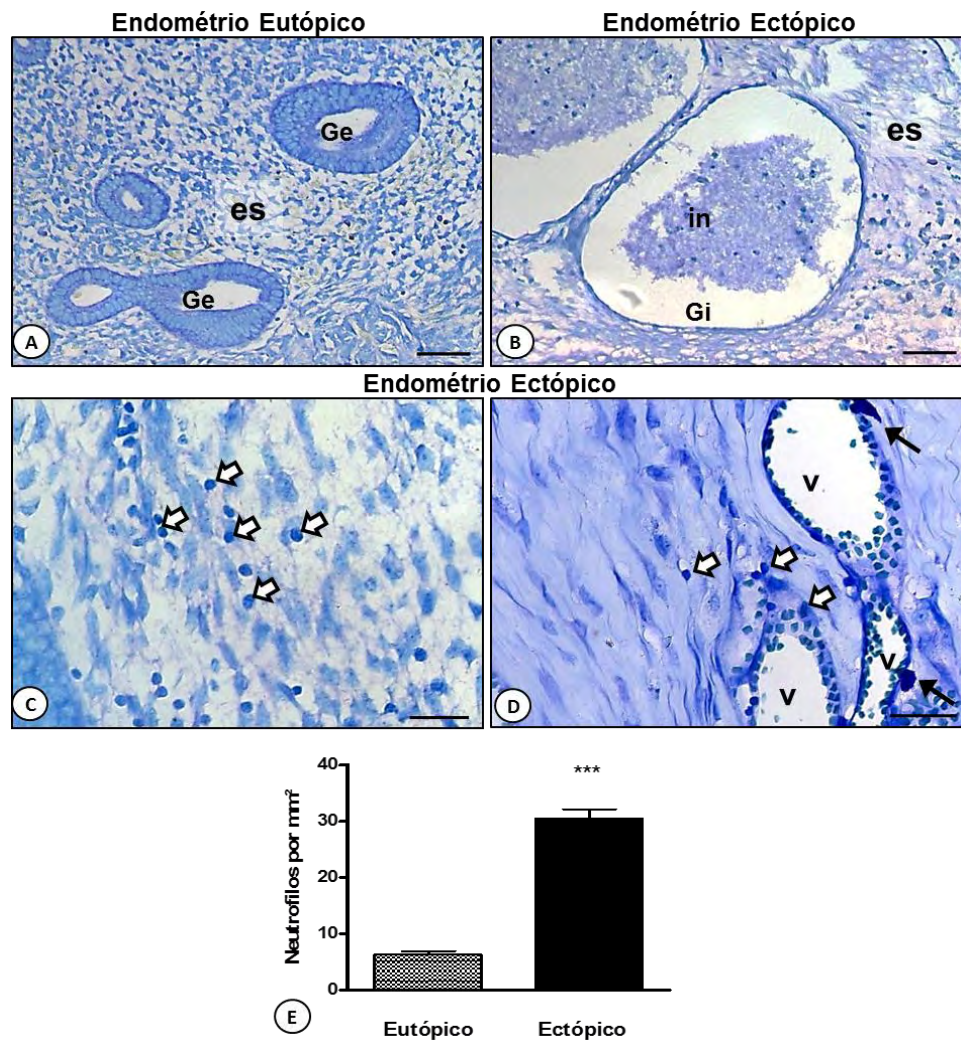


Figura 5. **Presença de células inflamatórias nos endométrios eutópico e ectópico.** **[A]** Endométrio eutópico. Estroma (es). Glândula endometrial (Ge). **[B]** Endométrio ectópico com glândula de padrão indiferenciado (Gi) e infiltrado inflamatório (in). **[C]** Células inflamatórias transmigradas no estroma de endométrio ectópico (setas brancas). **[D]** Mastócitos (setas) na periferia dos vasos (V) e leucócitos em processo de transmigração para o tecido (setas brancas). **[E]** Coloração: Azul de Toluidina. Barras: 50 μ m (A e B), 20 μ m (C e D). **[F]** Análise quantitativa de neutrófilos nos fragmentos endometriais. Os dados representam as médias \pm S.E.M. do número de células por mm² observadas em 27 campos analisados dos endométrios por paciente (eutópico, n = 10; ectópico, n = 18). ***P < 0,001 vs Eutópico.

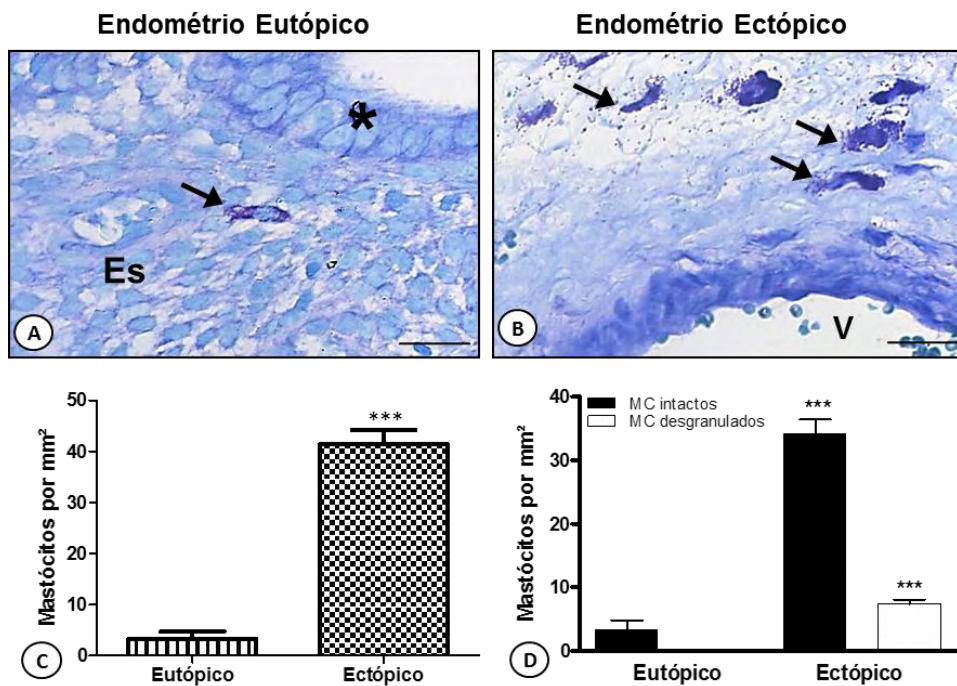


Figura 6. **Mastócitos na mucosa uterina.** [A] Célula intacta (seta) observada no estroma (Es) de endométrio eutópico e ao lado glândula uterina (asterisco). [B] Mastócitos desgranulados (setas) no endométrio ectópico. Vaso sanguíneo (V). Coloração: Azul de Toluidina. Barras: 20µm. [C, D] Análise quantitativa dos mastócitos nos fragmentos endometriais eutópicos (controle) e ectópicos. Os dados representam as médias ± S.E.M. do número total [C] e número de células intactas e desgranuladas [D] por mm² observadas em 27 campos analisados dos endométrios por paciente (eutópico, n = 10; ectópico, n = 18). ***P < 0,001 vs MC eutópico.

4.3. Análise da heterogeneidade dos mastócitos

A heterogeneidade dos mastócitos foi avaliada por meio da expressão das proteases triptase e quimase. Nos endométrios foram observadas células triptase e quimase-positivas localizadas no estroma e próximas às glândulas endometriais (Figuras 7A-D). As análises imuno-histoquímicas de secções seriadas dos endométrios eutópicos evidenciaram alta população de células triptase-positivas em relação às quimase-positivas (Figuras 6A e B), enquanto nos ectópicos esse predomínio não foi evidente (Figuras 7C e D). A quantificação dos mastócitos triptase-positivos nos fragmentos eutópicos e ectópicos não mostrou diferenças significantes nessa população de células (Figura 7E). No entanto, observamos aumento significativo de mastócitos quimase-positivos nos endométrios ectópicos comparados aos eutópicos (Figura 7E).

A análise densitométrica da expressão das proteases dos mastócitos não revelou diferenças nos níveis de triptase nos grânulos citoplasmáticos dessas células nos endométrios eutópicos e ectópicos (Figura 7F). No entanto, a expressão da quimase foi significativamente maior nos mastócitos de fragmentos ectópicos comparada aos mastócitos de eutópicos (Figura 7F).

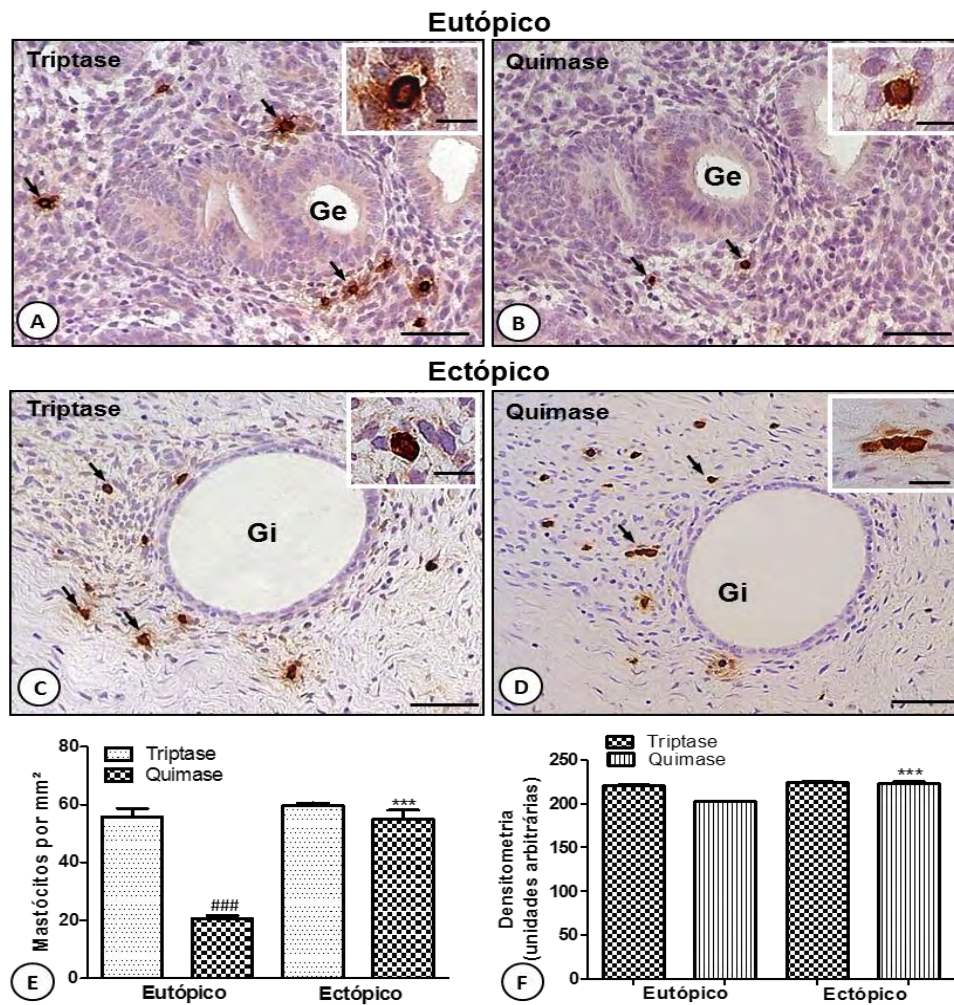


Figura 7. **Análise da heterogeneidade dos mastócitos.** Secções seriadas de endométrios eutópico [A, B] e ectópico [C, D] mostrando mastócitos triptase e quimase-positivos nas mesmas regiões (setas), próximos às glândulas endometriais (Ge) e indiferenciadas (Gi). Detalhe dos mastócitos nos cantos superiores direitos das figuras. Inclusão em parafina. Contra-coloração: Hematoxilina. Barras: 50µm (A-D); 10µm (detalhes). [E] Análise quantitativa dos mastócitos triptase e quimase-positivos nos endométrios eutópico e ectópico. Os dados representam as médias \pm S.E.M do número de células por mm² observados em 27 campos analisados nos endométrios por paciente (n=10/grupo). ####P<0,001 vs MC-triptase (eutópico); ***P< 0,001 vs MC-quimase (Eutópico). [F] Análise densitométrica da expressão de triptase e quimase nos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos. Os dados (unidades arbitrárias) representam as médias \pm S.E.M. de 20 células analisadas por paciente (n = 10/ grupo) dos grupos eutópico e ectópico. ***P< 0,001 vs quimase (Eutópico).

4.4. Expressão da ANXA1 nos endométrios eutópicos e ectópicos

A imunomarcção da proteína ANXA1 foi analisada nos endométrios eutópicos e ectópicos, e foi positiva nos epitélios glandulares, endotélio dos vasos, células estromais e neutrófilos (Figura 8). Uma intensa imunorreatividade para essa proteína foi observada em células epiteliais ciliadas de revestimento da mucosa uterina em endométrios eutópicos e ectópicos (Figura 8C). Os mastócitos da mucosa uterina também demonstraram imunorreatividade positiva para ANXA1 (Figura 9A e B) e, a confirmação desse tipo celular foi evidenciada por estudos de secções seriadas das biópsias coradas por Azul de Toluidina (Figura 9C e D).

Considerando a alteração no padrão glandular da endometriose, investigamos a modulação da expressão da ANXA1 nos epitélios glandulares de endométrios eutópicos e ectópicos. As células epiteliais de glândulas endometriais (eutópico) e diferenciadas (ectópico) apresentaram padrão semelhante na expressão de ANXA1 (Figura 10A e B). Nas glândulas indiferenciadas (ectópico) observamos intensa imunorreatividade para ANXA1 (Figura 10C) em comparação às glândulas endometriais e diferenciadas (Figura 10A e B). Nenhuma imunomarcção foi detectada nos cortes utilizados para controle da reação (Figura 10D). A análise densitométrica da expressão de ANXA1 nas células epiteliais glandulares confirmou as observações morfológicas, demonstrando aumento significativo nos níveis endógenos da ANXA1 nas glândulas indiferenciadas comparadas às diferenciadas dos endométrios ectópicos e glândulas controles dos eutópicos (Figura 10E).

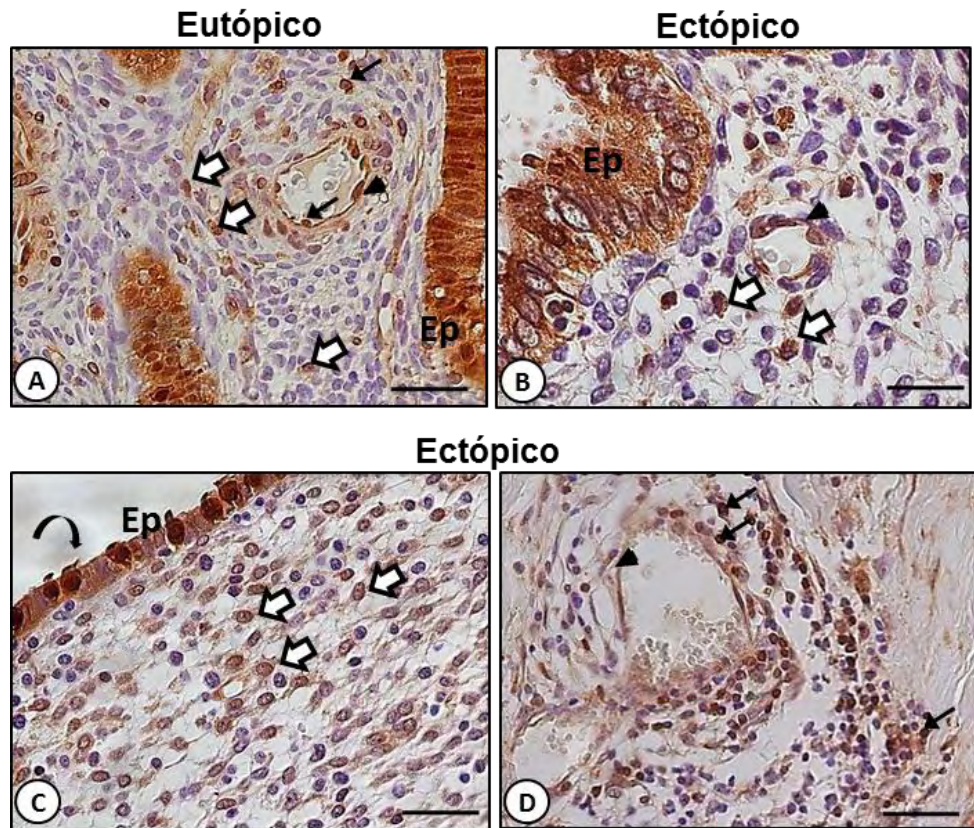


Figura 8. **Expressão da proteína ANXA1 nos endométrios eutópico e ectópico.** Endométrio eutópico **[A]** e ectópico **[B-D]** demonstrando imunorreatividade positiva para ANXA1 nas células epiteliais glandulares (Ep), endotélio (cabeças de seta), células estromais (setas brancas) e neutrófilos presentes no infiltrado inflamatório (setas pretas). Intensa imunorreatividade para ANXA1 nas células epiteliais ciliadas de revestimento da mucosa uterina (seta curva; **C**) em relação as células não ciliadas. Contra-coloração: Hematoxilina. Barras: 20 μ m.

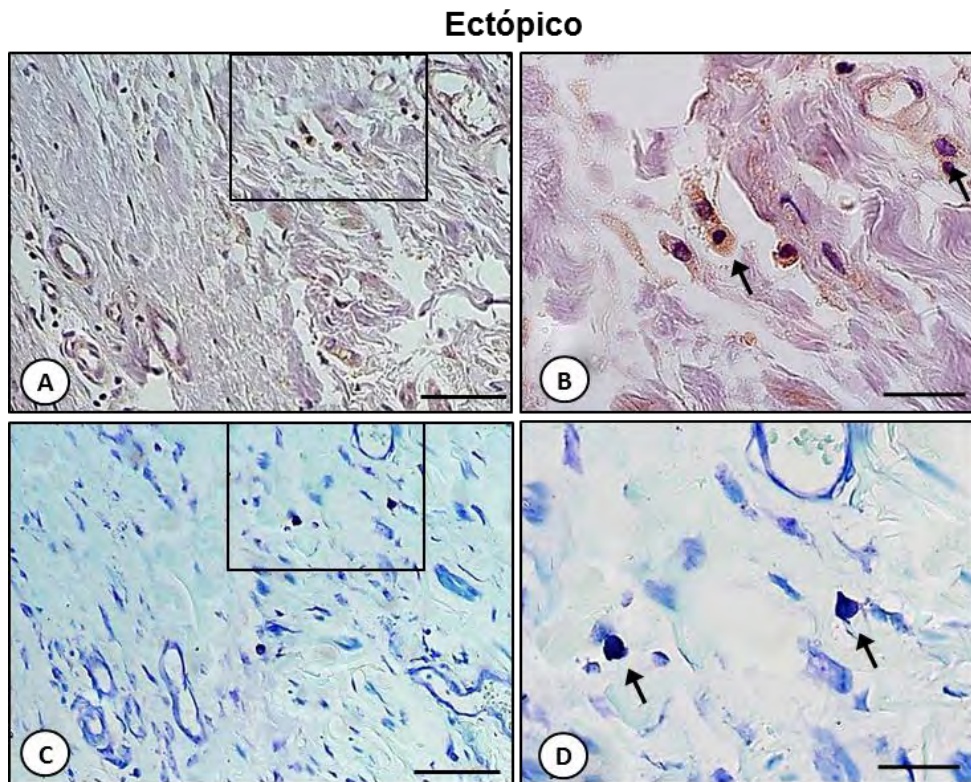


Figura 9. **Expressão da ANXA1 em mastócitos no endométrio ectópico.** [A, C] Secções seriadas de endométrio ectópico. [B, D] Detalhes das áreas retangulares das figuras A e C, demonstrando a reatividade positiva dos mastócitos para ANXA1 (setas; B) e a metacromasia nos grânulos citoplasmáticos dessas células (setas; D) após coloração por azul de toluidina. Contra-coloração: Hematoxilina (A, B). Coloração: Azul de toluidina (C, D). Barras: 50 μ m (A, C), 20 μ m (B, D).

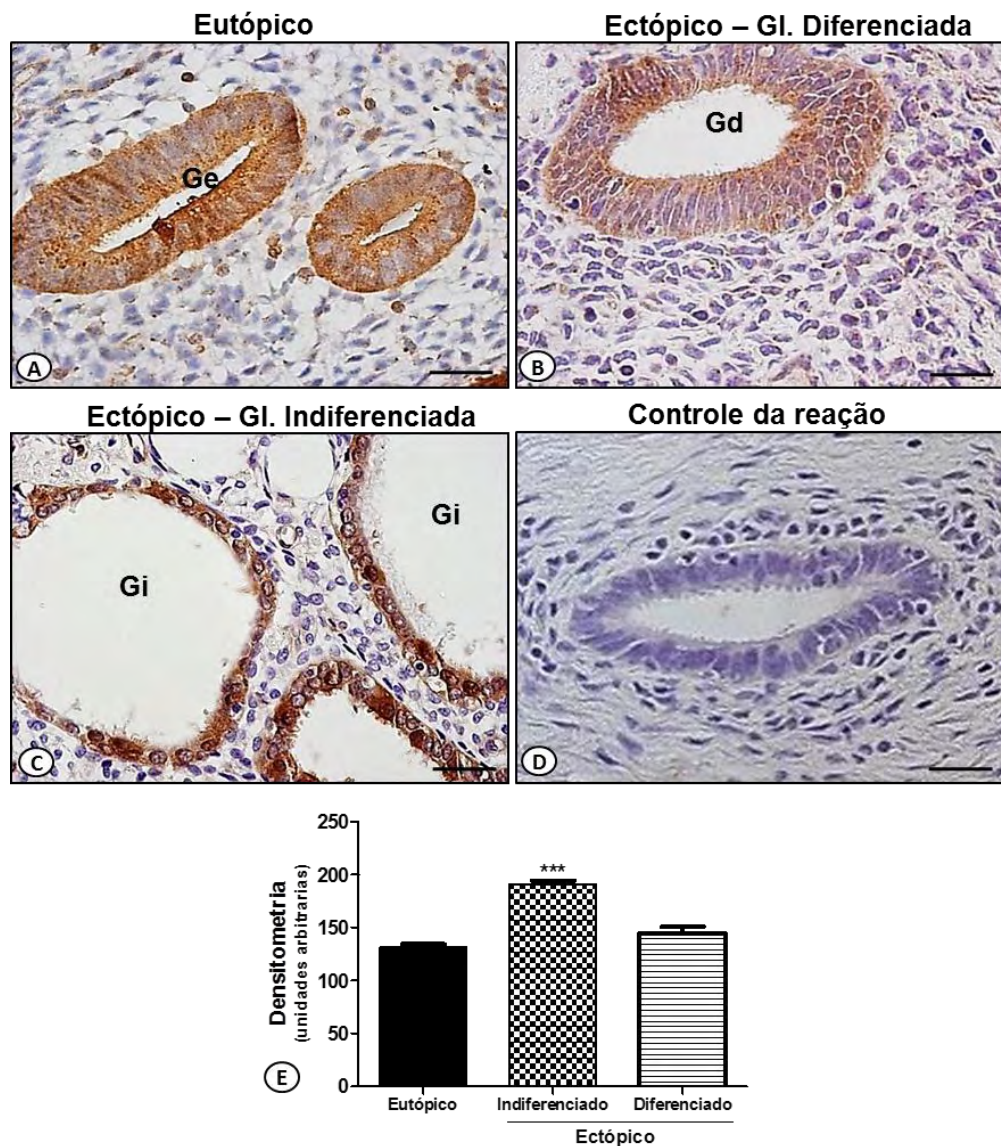


Figura 10. **Expressão da proteína ANXA1 nas células epiteliais glandulares endometriais.** Glândula endometrial (Ge) em fragmento eutópico [A] demonstrando expressão de ANXA1 semelhante à glândula diferenciada (Gd) em ectópico [B]. [C] Glândula indiferenciada (Gi) no endométrio ectópico mostrando intensa imunorreatividade de ANXA1. [D] Controle da reação. Contra-coloração: Hematoxilina. Barras: 20 μ m. [E] Análise densitométrica da expressão de ANXA1 no epitélio glandular. Os dados (unidades arbitrárias) representam as médias \pm S.E.M. dos epitélios glandulares observados em endométrios eutópicos (n=10) e ectópicos (n=18). ***P< 0,001 vs eutópico e diferenciado (ectópico).

4.5. Expressão de FPR1 nos endométrios eutópicos e ectópicos

Os endométrios eutópicos e ectópicos apresentaram imunorreatividade positiva para o FPR1 com padrão semelhante ao observado para a proteína ANXA1. O receptor foi detectado nas células entoteliais, estromais, inflamatórias, sobretudo neutrófilos, e nas epiteliais glandulares.

Para investigarmos a correlação da expressão de FPR1 e ANXA1, analisamos a imunorreatividade do receptor nos diferentes padrões morfológicos glandulares dos endométrios eutópicos e ectópicos. As células epiteliais das glândulas endometriais controle (eutópico) e diferenciadas (ectópico) apresentaram expressão semelhante de FPR1 (Figura 11A e B), enquanto intensa imunorreatividade foi detectada nas glândulas indiferenciadas (ectópico) (Figura 11C). Nenhuma imunomarcção foi detectada nos cortes utilizados para controle da reação (Figura 11D).

A análise densitométrica da expressão do FPR1 nas células epiteliais glandulares confirmou as observações morfológicas, demonstrando aumento significativo nos níveis endógenos de FPR1 nas glândulas indiferenciadas comparadas às diferenciadas dos endométrios ectópicos e glândulas endometriais dos eutópicos (Figura 11E).

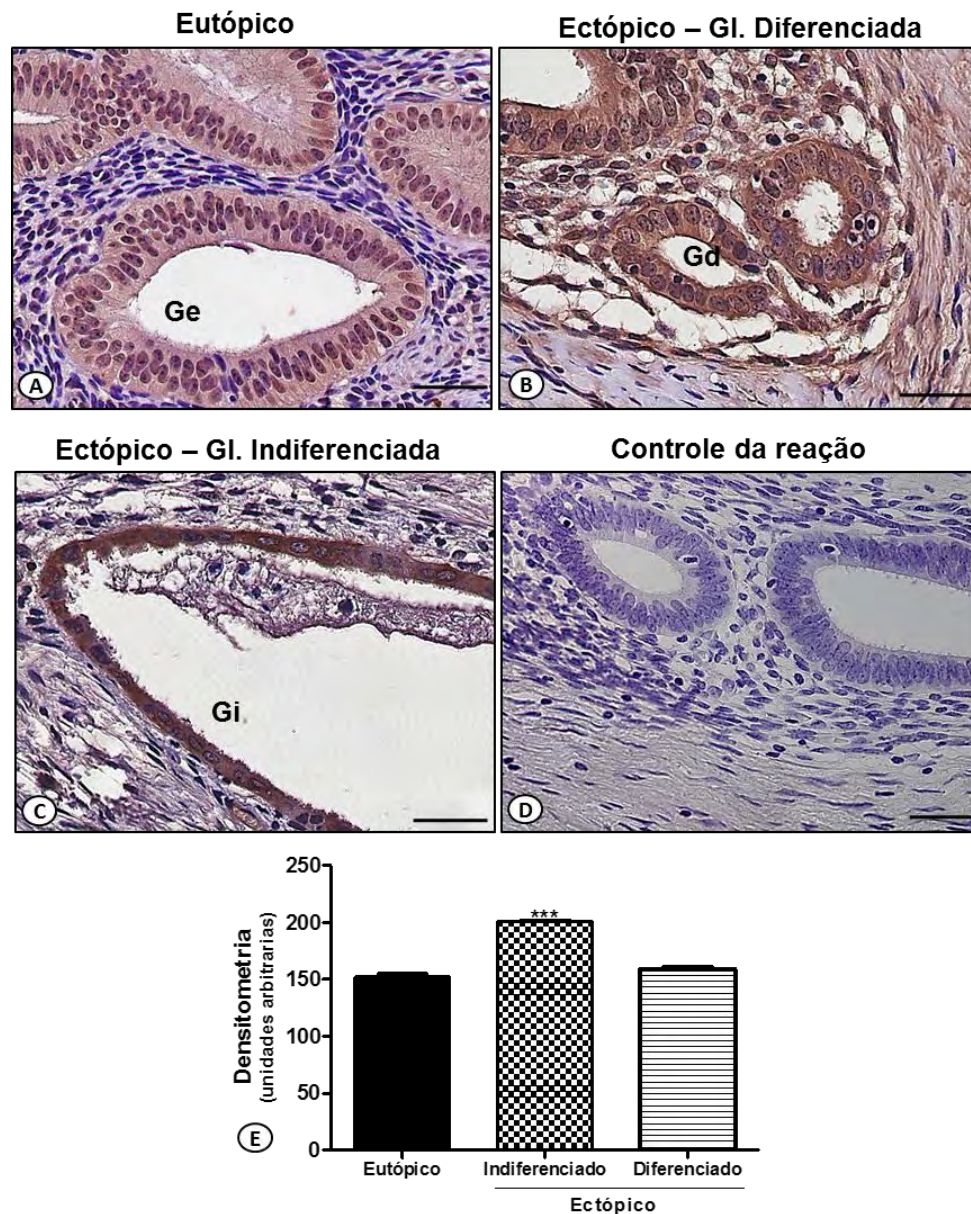


Figura 11. **Expressão do receptor FPR1 da proteína ANXA1 nas células epiteliais glandulares endometriais.** Glândula endometrial (Ge) no endométrio eutópico [A] demonstrando expressão de FPR1 semelhante à glândula diferenciada (Gd) no implante ectópico [B]. [C] Intensa imunorreatividade de FPR1 em glândula indiferenciada (Gi) do endométrio ectópico. [D] Controle da reação. Contra-coloração: Hematoxilina. Barras: 20µm (A-C), 50 µm. [E] Análise densitométrica da expressão de FPR1 no epitélio glandular. Os dados (unidades arbitrárias) representam as médias \pm S.E.M. dos epitélios glandulares observados em endométrios eutópicos (n=10) e ectópicos (n=18). ***P< 0,001 vs eutópico e diferenciado (ectópico).

5. DISCUSSÃO

A endometriose representa uma doença contínua e progressiva de etiologia, fisiopatologia e história natural mal conhecidas. As teorias sobre a implantação e metaplasia explicam o mecanismo de iniciação das lesões endometrióticas, mas não explicam as diferentes manifestações clínicas da doença (WU et al., 2007). Além disso, vários sistemas de classificação têm sido propostos através dos anos para estabelecer uma correspondência eficaz entre a classificação histológica da endometriose e o prognóstico da doença (HOEGER & GUZICK, 1997; HOEGER & GUZICK, 1999; SCURRY; WHITEHEAD; HEALEY, 2001)

No nosso estudo avaliamos 18 biópsias de pacientes diagnosticadas com endometriose de parede abdominal (endometrioma), por meio de análises histológicas. As lesões apresentaram padrão morfológico glandular caracterizado em dois tipos: indiferenciado (n = 7) e misto (n = 11), cuja classificação histológica utilizada foi proposta por Abrao et al. (2003), avaliando casos de endometriose pélvica. O critério utilizado para o diagnóstico de endometriose foi a identificação de estroma endometriode ou elementos epiteliais do tecido, com ou sem estroma, e associação com sinais de hemorragia e fibrose. As lesões foram classificadas morfolologicamente com base na variação do aspecto das estruturas endometriais ectópicas, conforme citação anterior em padrão glandular bem diferenciado, misto, indiferenciado e padrão estromal puro. As análises demonstraram que a fase inicial da endometriose (estádios I e II de acordo com a classificação proposta pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva – ASRM, 1996) está associada com os padrões histológicos estromal e glandular bem diferenciado, enquanto a fase mais avançada da doença (estádios III e IV) com os padrões glandulares misto ou indiferenciado.

As diferenciações histológicas em 271 biópsias de 176 pacientes com endometriose superficial, profunda ou endometrioma ovariano foram avaliadas por Kamergorodsky et al. (2009) de acordo com a classificação proposta por Abrao et al. (2003). Os dados mostram predomínio do padrão glandular indiferenciado e misto nas biópsias de endometriose profunda (33,5% e 46,9%, respectivamente) e endometrioma (40,5% e 37,8%), enquanto o padrão glandular diferenciado (41,8%) foi mais frequente nas lesões por endometriose

superficial, correlacionando os casos de maior indiferenciação com maior gravidade da doença. Os nossos dados de classificação morfológica estão de acordo com esse estudo, que mostra a possível falha na resposta supressora dos componentes do fluido peritoneal permitindo que esses focos endometrióticos se infiltrem mais profundamente nos tecidos.

Os laudos e prontuários obtidos sobre o histórico clínico das pacientes investigadas com endometrioma de parede abdominal mostraram associação da doença a mulheres que tiveram filhos por meio de cirurgia cesariana (83%) e, a maioria, apresentava histórico de dor pélvica crônica ou na fossa ilíaca (direita ou esquerda), com piora no período menstrual, dismenorreia, dispareunia e alterações intestinais. Esses dados estão de acordo com os descritos na literatura (ABRAO et al., 2003). Estudo desenvolvido no Hospital Estadual Azevedo Lima, Niterói (RJ), relatou estreita relação da localização do endometrioma de parede abdominal próxima à cicatriz cesariana de 13 das 14 pacientes que sofreram esse tipo de parto (ACCETTA et al., 2011; OZEL et al., 2012). Ainda, uma pesquisa epidemiológica (BELLELIS et al., 2010; OZEL et al., 2012), envolvendo 892 pacientes com endometriose pélvica, realizada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) - SP, descreveu como principais sintomas das pacientes: dor pélvica crônica (56,8%), dispareunia (54,7%), alterações intestinais (48,3%), infertilidade (39,8%), dismenorreia (28,4%) e alterações urinárias (11,7%).

A inflamação é o principal fator contribuinte para o desenvolvimento dos principais sintomas da endometriose, tais como dismenorreia, dispareunia, dor pélvica e infertilidade, que afetam diretamente a qualidade de vida das pacientes (POLINESS et al., 2004). A dismenorreia e dispareunia têm relação direta com a liberação de prostaglandinas, que são mediadores pró-inflamatórios quimiotáticos e que aumentam a permeabilidade vascular, agravando o processo de inflamação (KOIKE et al., 1992). Os mastócitos são os principais produtores de prostaglandinas no endométrio, pois são células residentes no tecido conjuntivo e relacionadas às primeiras fases de resposta imunológica local (GALLI, GRIMBALDESTON; TSAI, 2008).

As análises quantitativas de células inflamatórias revelaram aumento significativo do número de mastócitos intactos e desgranulados nos endométrios ectópicos em comparação aos eutópicos (controles). Essas células foram localizadas próximas as glândulas e vasos sanguíneos no estroma ectópico, em geral desgranuladas. Mastócitos desgranulados também foram relatados em tecidos de endometriose em outros estudos, corroborando nossas investigações (IHARA; UCHIIDE; SUGAMATA, 2004; KEMPURAJ et al., 2004; MENZIES et al., 2010). Ainda, em modelo experimental de endometriose, ratas tratadas com o antagonista do receptor de leucotrienos apresentam inibição significativa da infiltração e ativação dos mastócitos nas lesões endometriais (IHARA; UCHIIDE; SUGAMATA, 2004). Lesões endometrióticas de infiltração profunda e geralmente associadas a dor pélvica também apresentam um número elevado de mastócitos ativados juntos aos nervos periféricos, em relação às observadas na endometriose peritoneal e ovariana (ANAF et al., 2006). Esses dados sugerem um papel dos mastócitos na formação da fibrose e no processo de adesão da endometriose, assim como na produção de dor.

Os neutrófilos também foram observados em números elevados nos endométrios ectópicos, resultado do recrutamento dessas células da circulação sanguínea para as lesões. A importância dos mastócitos na migração de neutrófilos em modelo de peritonite foi demonstrada por Ajuebor et al., 1999. Usando um método de depleção seletiva dessas células pelo composto 48/80, os pesquisadores demonstraram diminuição do influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal, após 4 horas da indução de peritonite, comparado aos animais com mastócitos não depletados. De fato, os mastócitos produzem potentes mediadores biologicamente ativos, tais como histamina, TNF- α , IL-10 e as serina proteases triptase e quimase, que induzem mudanças rápidas e intensas nas propriedades de adesão entre os leucócitos e o endotélio (Kalesnikoff e Galli, 2008; Pejler, Rönnberg et al., 2010) e, possivelmente, contribuem para o recrutamento dessas células na endometriose. Ainda, estudos *in vitro* usando co-cultura de mastócitos e células endometriais humanas demonstraram que as primeiras são importantes para estimular a produção de metaloproteinases (MMP), particularmente MMP-1 e MMP-3, por meio dos mediadores IL-1,

TNF- α e triptase (ZHANG et al., 1998). Esse papel seria importante para induzir uma cascata de ativação de MMPs na matriz extracelular do endométrio, resultando na menstruação.

Nesse aspecto, avaliamos a expressão das proteases triptase e quimase nos mastócitos dos endométrios eutópicos e ectópicos para verificar a heterogeneidade desse tipo celular. As análises quantitativas dessas células demonstraram nos endométrios eutópicos um predomínio da subpopulação de mastócitos triptase-positivos (MC_T) em relação aos quimase-positivos. Esses dados estão de acordo com os estudos que detectaram um predomínio da subpopulação de MC_T na camada funcional do endométrio, em 107 biópsias de endométrios eutópicos de mulheres sem endometriose ou leiomioma e sem tratamento hormonal por 1 ano (JEZIORSKA; SALAMONSEN; WOOLLEY, 1995).

Por outro lado, nos endométrios ectópicos mostramos aumento significativo de células quimase-positivas em relação aos eutópicos, evidenciando uma mudança no padrão dos subtipos de mastócitos associada a lesão. Ainda, as análises densitométricas revelaram aumento nos níveis endógenos da quimase, mas não da triptase, nos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos dos endométrios ectópicos comparados aos subtipos celulares dos eutópicos. Dados semelhantes foram relatados em estudos envolvendo 69 biópsias de cinco tipos de endometriose (peritoneal, ovariana, ligamentos útero-sacros, septo-útero-vaginal e intestinal), mostrando aumento significativo na subpopulação de mastócitos quimase-positivos (ANAF et al., 2006). Esse mesmo trabalho demonstrou aumento significativo do número de mastócitos triptase-positivos nas lesões, com exceção das endometrioses peritoneal e de ligamentos útero-sacros, em relação aos tecidos de regiões não afetadas pela endometriose (controles). Esses dados demonstram que a alteração na heterogeneidade dos mastócitos é dependente do tipo e localização da endometriose. Ainda, considerando a quimase como a primeira protease expressa nos mastócitos durante seu amadurecimento (MA et al., 2008; PEJLER et al., 2010), a detecção de um número aumentado de células quimase-positivas sugere um predomínio de células imaturas nos diferentes tipos de endometriose. Ressaltamos também, que os níveis

aumentados da quimase, na endometriose de parede abdominal, possivelmente contribuem na patogênese da doença por meio de suas funções pró-inflamatórias, tais como: degradação da matriz extracelular por ação direta (quebra do colágeno, fibronectina) ou indireta (ativação de MMPs), aumento da permeabilidade vascular pela degradação de junções celulares, ativação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-18) e neovascularização (ativação da cascata de angiotensina II) (PEJLER et al., 2010; LUNDEQUIST & PEJLER, 2011; TAKAI; JIN; MIYAZAK, 2012).

Além das proteases triptase e quimase, os mastócitos também expressam outros potentes mediadores biologicamente ativos, tais como a proteína anti-inflamatória ANXA1. No entanto, sua relação com a endometriose tem sido pouco explorada na literatura. Nesse aspecto, nossos estudos inicialmente confirmaram a expressão da ANXA1 nos mastócitos, neutrófilos e células endoteliais nos endométrios eutópicos e ectópicos, como descrito na literatura (OLIANI et al., 2000; GIL et al., 2006; SENA et al., 2006). Os neutrófilos humanos possuem altos níveis de ANXA1 (aproximadamente 1-2% do total de proteínas citosólicas) e podem externalizar grande quantidade de proteína (>50%) em adesão à monocamada de células endoteliais (OLIANI & GIL, 2006). A ANXA1, exposta sobre a membrana plasmática do neutrófilo aderente, exerce uma ação inibitória, reduzindo a extensão da transmigração através das células endoteliais (OLIANI & GIL, 2006). Outros estudos mostram que ANXA1 está envolvida na apoptose de neutrófilos sendo uma via importante para limitação da resposta inflamatória (D'ACQUISTO et al., 2008). Em mastócitos, os níveis endógenos de ANXA1 aumentam em resposta ao tratamento por glicocorticoide (OLIANI et al., 2000; GIL et al., 2006; SENA et al., 2006), inflamação crônica (OLIANI et al., 2008) e tumorigênese (SILISTINO-SOUZA et al., 2007). Portanto, os neutrófilos e mastócitos representam importantes fontes de ANXA1 para o tecido e, conseqüentemente, contribuem para a regulação da resposta inflamatória desencadeada pela endometriose.

A proteína ANXA1 também foi detectada nas células estromais e epitélios glandulares, particularmente apresentando intensa imunorreatividade nas células epiteliais ciliadas de revestimento da mucosa uterina em endométrios eutópicos e ectópicos. Esses dados

corroboram estudos proteômicos, de *Western blotting* e imuno-histoquímicos que demonstraram a ANXA1 como componente dos axonemas ciliares de células epiteliais ciliadas da mucosas nasal (RODRIGO TAPIA et al., 2004) e de brônquio humanas (OSTROWSKI et al., 2002), de brônquio bovina (VISHWANATHA et al., 1995) e de traquéia em coelhos (MAYRAN et al., 1996). No sistema genital feminino, a alta expressão dessa proteína foi demonstrada na placenta, ovários e útero gravídico de coelhos comparados aos órgãos na fase não gestacional (TSAO; CHEN; TS'AO, 1995). Em humanos, estudos de RT-PCR e *Western blotting* envolvendo a mucosa uterina mostraram que os níveis endógenos do RNAm e proteína ANXA1 não são influenciados pelo ciclo menstrual (LI et al., 2008). No entanto, em endométrios eutópicos de pacientes com endometriose, os níveis de ANXA1 são elevados, quando comparados a pacientes sem a doença (LI et al., 2008).

De fato, em nossas análises imuno-histoquímicas e de densitometria da expressão de ANXA1 em endométrios ectópicos detectamos significativo aumento de seus níveis endógenos nos epitélios glandulares indiferenciados em relação às glândulas endometriais (controle - eutópico) e diferenciadas de endométrios ectópicos. Essa diferença também foi relatada em endométrios eutópicos de pacientes com endometriose nos estágios de II a IV, de acordo com a ASRM, que apresentaram alta imunorreatividade para ANXA1 nas células epiteliais glandulares em relação aos endométrios eutópicos de pacientes sem endometriose (LI et al., 2008).

A maioria dos estudos envolvendo a ANXA1 e as células epiteliais demonstram seu papel na proliferação celular relacionado à tumorigênese. Em tumores de cabeça e pescoço (SILISTINO-SOUZA et al., 2007), esôfago e próstata (PAWELETZ et al., 2000; INOKUCHI et al., 2009), um pior prognóstico está associado à diminuição significativa da ANXA1 nas células epiteliais, possivelmente pela perda de sua função anti-proliferativa. Por outro lado, tumores da glândula pituitária (Mulla et al., 2004) e de pâncreas (BAI et al., 2004) estão associados a altos níveis de expressão da ANXA1 que provavelmente atua com um papel proliferativo induzindo a ação de diferentes mitógenos. Recentemente, esse papel proliferativo da ANXA1 foi elucidado em células tumorais de mama por meio de ensaios *in vitro* utilizando diferentes mitógenos e RNAs de interferência para diminuir a expressão de ANXA1 e seus receptores de peptídeo formilados (FPR) (KHAU et al., 2011). Os ensaios permitiram concluir que a ANXA1 atua nessas células por meio de seus receptores FPR1 e FPR2, ativando a cascata de indução da mitose pela ciclina D1.

Considerando esses dados, e que poucos trabalhos investigaram a expressão de FPRs no endométrio humano, o próximo passo do nosso estudo foi correlacionar o FPR1 e o

desenvolvimento do endometrioma. As análises imuno-histoquímicas demonstraram, pela primeira vez em endométrio humano, que a expressão do FPR1 ocorre nas mesmas regiões caracterizadas para a ANXA1. Os endométrios eutópicos e ectópicos apresentaram imunorreatividade semelhante para o FPR1, particularmente nas células inflamatórias, estromais e endoteliais. No entanto, aumento significativo desse receptor foi evidenciado nas glândulas indiferenciadas dos endométrios ectópicos em relação aos outros padrões de glândulas observadas (normal-eutópico; diferenciada-ectópico), assim como mostrado para ANXA1. Dessa maneira, o aumento nos níveis endógenos de ANXA1 e de seu receptor FPR1 nas células epiteliais glandulares de endométrios ectópicos possivelmente contribui para a proliferação dessas células e, conseqüentemente, para o desenvolvimento da endometriose.

Em conjunto, os nossos resultados mostram que a endometriose de parede abdominal apresenta alterações nos dois compartimentos teciduais: estroma e epitélio. No estroma, ocorre influxo de neutrófilos e alteração na heterogeneidade dos mastócitos, que modulam seus níveis endógenos de quimase, um potente mediador pró-inflamatório. No epitélio, os altos níveis de ANXA1 e FPR1 se correlacionam com as alterações morfológicas desse tecido, possivelmente participando dos processos de diferenciação e proliferação celular. A ilustração da Figura 12 mostra nossa hipótese para os mecanismos de ação da quimase e ANXA1 na endometriose.

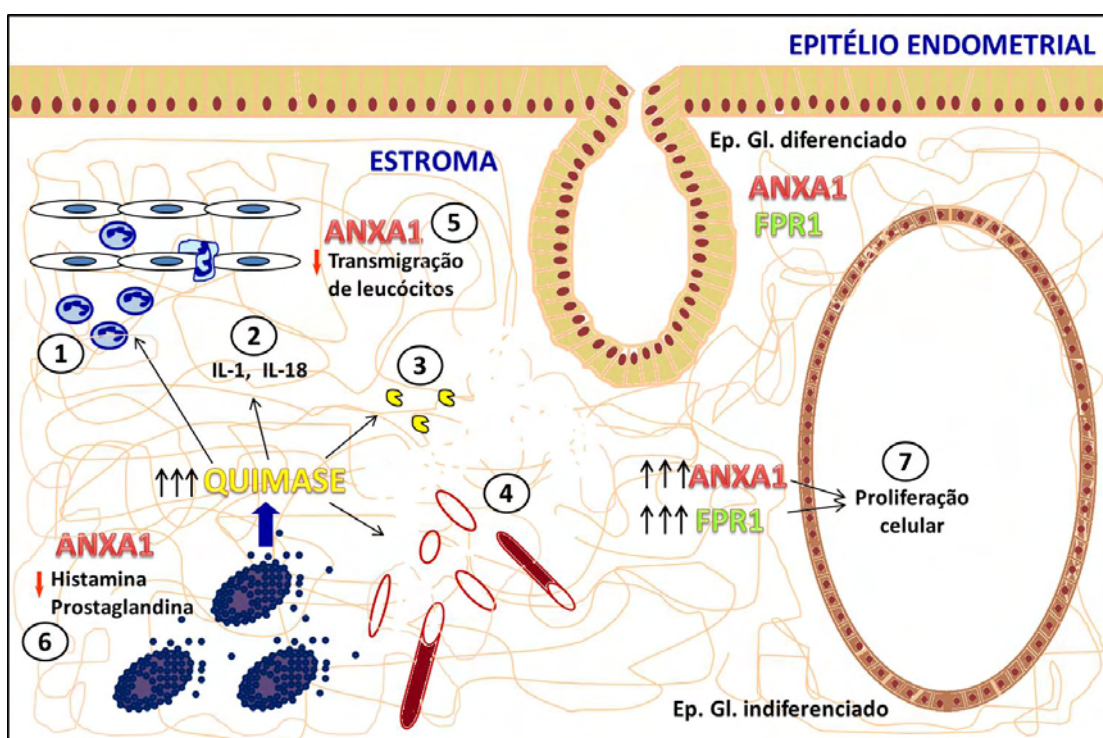


Figura 12. **Hipótese dos mecanismos de ação da quimase e ANXA1 na endometriose de parede abdominal.** A protease quimase, derivada dos mastócitos, contribui para o desenvolvimento da endometriose, particularmente afetando o estroma endometrial, por meio de suas atividades pró-inflamatórias (PEJLER et al., 2010): **[1]** aumento de permeabilidade vascular e influxo de neutrófilos; **[2]** ativação de citocinas pró-inflamatórias que intensificam recrutamento de células imunes inatas; **[3]** degradação de matriz extracelular facilitando a migração de células no estroma endometrial; e **[4]** indução de angiogênese favorecendo proliferação de lesões ectópicas. A proteína ANXA1, derivada de células imunes e epiteliais, atua no estroma e epitélio endometrial. No estroma essa proteína exerce atividades anti-inflamatórias, sobretudo inibição do processo de transmigração de leucócitos **[5]** (OLIANI & GIL, 2006) e, liberação de mediadores pelos mastócitos **[6]** (KAMAL; FLOWER; PERRETTI, 2005; YAZID et al., 2010). No epitélio, a ANXA1 e seu receptor FPR1 contribuem para os processos de ativação e proliferação celular **[7]**, favorecendo o desenvolvimento das lesões.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos concluímos que:

1. Os endometriomas de parede abdominal apresentam dois padrões de endometriose glandular: misto e indiferenciado, ambos associados a alta infiltração inflamatória.
2. Os endométrios ectópicos mostram número significativamente maior de neutrófilos e mastócitos ativados em relação aos eutópicos.
3. A heterogeneidade dos mastócitos é alterada na endometriose de parede abdominal com aumento significativo do número de células quimase-positivas. Os mastócitos triptase-positivos não sofreram alterações significantes.
4. Os mastócitos dos endométrios ectópicos apresentam aumento significativo na expressão de quimase em seus grânulos citoplasmáticos, em relação às células dos eutópicos.
5. A expressão do receptor FPR1 é mostrada pela primeira vez no endométrio humano e, ocorre exatamente nas mesmas regiões histológicas observadas para a ANXA1.
6. As células epiteliais glandulares indiferenciadas de endométrios ectópicos mostram aumento significativo nos níveis endógenos da ANXA1 e do seu receptor FPR1 em relação às glândulas dos eutópicos.

Associadas, essas conclusões mostram que a quimase, a ANXA1 e o FPR1 estão envolvidos na fisiologia do endométrio em condições normais e durante processos inflamatórios e proliferativos. Desse modo, os nossos resultados apontam essas proteínas como alvos promissores para terapias inovadoras no tratamento e possível prevenção da endometriose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAO, M. S. et al. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 82, n. 1, p. 31-40, Jul 2003. ISSN 0020-7292. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12834939> >.

ACCETTA, I. et al. Abdominal wall endometrioma. **Rev Col Bras Cir**, v. 38, n. 1, p. 41-4, 2011 Jan-Feb 2011. ISSN 1809-4546. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537742> >.

ALLCOCK, G. H. et al. Neutrophil accumulation induced by bacterial lipopolysaccharide: effects of dexamethasone and annexin 1. **Clin Exp Immunol**, v. 123, n. 1, p. 62-7, Jan 2001. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11167999> >.

ALVAREZ, V. et al. A physical map of two clusters containing the genes for six proinflammatory receptors. **Immunogenetics**, v. 40, n. 2, p. 100-3, 1994. ISSN 0093-7711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8026857> >.

ANAF, V. et al. Pain, mast cells, and nerves in peritoneal, ovarian, and deep infiltrating endometriosis. **Fertil Steril**, v. 86, n. 5, p. 1336-43, Nov 2006a. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17007852> >.

_____. Pain, mast cells, and nerves in peritoneal, ovarian, and deep infiltrating endometriosis. **Fertil Steril**, v. 86, n. 5, p. 1336-43, Nov 2006b. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17007852> >.

ARAUJO, L. P. et al. Interaction of the anti-inflammatory annexin A1 protein and tacrolimus immunosuppressant in the renal function of rats. **Am J Nephrol**, v. 31, n. 6, p. 527-33, 2010. ISSN 1421-9670. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20484890> >.

AUGOULEA, A. et al. Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress. **Arch Gynecol Obstet**, v. 286, n. 1, p. 99-103, Jul 2012. ISSN 1432-0711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546953> >.

BAI, X. F. et al. Overexpression of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 10, p. 1466-70, May 2004. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15133855> >.

BAO, L. et al. Mapping of genes for the human C5a receptor (C5AR), human FMLP receptor (FPR), and two FMLP receptor homologue orphan receptors (FPRH1, FPRH2) to chromosome 19. **Genomics**, v. 13, n. 2, p. 437-40, Jun 1992. ISSN 0888-7543. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1612600> >.

BELLELIS, P. et al. Epidemiological and clinical aspects of pelvic endometriosis—a case series. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, n. 4, p. 467-71, 2010 Jul-Aug 2010. ISSN 0104-4230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20835646> >.

BIANCO, B. et al. The possible role of genetic variants in autoimmune-related genes in the development of endometriosis. **Hum Immunol**, v. 73, n. 3, p. 306-15, Mar 2012. ISSN 1879-1166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22222816> >.

BROWN, J.; KIVES, S.; AKHTAR, M. Progestagens and anti-progestagens for pain associated with endometriosis. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 3, p. CD002122, 2012. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22419284> >.

CRAMER, D. W.; MISSMER, S. A. The epidemiology of endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 955, p. 11-22; discussion 34-6, 396-406, Mar 2002. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11949940> >.

D'ACQUISTO, F. et al. Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 1095-102, Feb 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008549> >.

_____. Glucocorticoid treatment inhibits annexin-1 expression in rheumatoid arthritis CD4+ T cells. **Rheumatology (Oxford)**, v. 47, n. 5, p. 636-9, May 2008. ISSN 1462-0332. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18390587> >.

DIACONU, N. C. et al. Mast cell chymase is present in uterine cervical carcinoma and it detaches viable and growing cervical squamous carcinoma cells from substratum in vitro. **Arch Dermatol Res**, v. 303, n. 7, p. 499-512, Sep 2011. ISSN 1432-069X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21274549> >.

DUFTON, N.; PERRETTI, M. Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. **Pharmacol Ther**, v. 127, n. 2, p. 175-88, Aug 2010. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20546777> >.

DYDUCH, G.; KACZMARCZYK, K.; OKOŃ, K. Mast cells and cancer: enemies or allies? **Pol J Pathol**, v. 63, n. 1, p. 1-7, Mar 2012. ISSN 1233-9687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22535614> >.

ERNST, J. D. et al. Purification and characterization of an abundant cytosolic protein from human neutrophils that promotes Ca²⁺(+)-dependent aggregation of isolated specific granules. **J Clin Invest**, v. 85, n. 4, p. 1065-71, Apr 1990. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2138632> >.

ERNST, S. et al. An annexin 1 N-terminal peptide activates leukocytes by triggering different members of the formyl peptide receptor family. **J Immunol**, v. 172, n. 12, p. 7669-76, Jun 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15187149> >.

FLOWER, R. J. Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. **Br J Pharmacol**, v. 94, n. 4, p. 987-1015, Aug 1988. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2974738> >.

GALLI, S. J.; GRIMBALDESTON, M.; TSAI, M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 6, p. 478-86, Jun 2008. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483499> >.

GAO, J. L. et al. Differential expansion of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human and mouse. **Genomics**, v. 51, n. 2, p. 270-6, Jul 1998. ISSN 0888-7543. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9722950> >.

GASTARDELO, T. S. et al. Functional and ultrastructural analysis of annexin A1 and its receptor in extravasating neutrophils during acute inflammation. **Am J Pathol**, v. 174, n. 1, p. 177-83, Jan 2009. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19095957> >.

GAVINS, F. N. et al. Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 4140-7, May 2003. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560218> >.

GIL, C. D. et al. Interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3. **Cell Biol Int**, v. 30, n. 4, p. 338-44, Apr 2006a. ISSN 1065-6995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16530434> >.

GIUDICE, L. C.; KAO, L. C. Endometriosis. **Lancet**, v. 364, n. 9447, p. 1789-99, 2004 Nov 13-19 2004. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541453> >.

GOULDING, N. J. et al. Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone. **Lancet**, v. 335, n. 8703, p. 1416-8, Jun 1990. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1972208> >.

GURISH, M. F.; AUSTEN, K. F. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. **Immunity**, v. 37, n. 1, p. 25-33, Jul 2012. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22840841> >.

HOEGER, K. M.; GUZICK, D. S. Classification of endometriosis. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 24, n. 2, p. 347-59, Jun 1997. ISSN 0889-8545. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9163771> >.

_____. An update on the classification of endometriosis. **Clin Obstet Gynecol**, v. 42, n. 3, p. 611-9, Sep 1999. ISSN 0009-9201. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10451773> >.

IHARA, T.; UCHIIDE, I.; SUGAMATA, M. Light and electron microscopic evaluation of antileukotriene therapy for experimental rat endometriosis. **Fertil Steril**, v. 81 Suppl 1, p. 819-23, Mar 2004a. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019815> >.

_____. Light and electron microscopic evaluation of antileukotriene therapy for experimental rat endometriosis. **Fertil Steril**, v. 81 Suppl 1, p. 819-23, Mar 2004b. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019815> >.

INOKUCHI, J. et al. Loss of annexin A1 disrupts normal prostate glandular structure by inducing autocrine IL-6 signaling. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 7, p. 1082-8, Jul 2009. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19351789> >.

JEZIORSKA, M.; SALAMONSEN, L. A.; WOOLLEY, D. E. Mast cell and eosinophil distribution and activation in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Biol Reprod**, v. 53, n. 2, p. 312-20, Aug 1995. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7492683> >.

JIANG, Q. Y.; WU, R. J. Growth mechanisms of endometriotic cells in implanted places: a review. **Gynecol Endocrinol**, v. 28, n. 7, p. 562-7, Jul 2012. ISSN 1473-0766. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22296665> >.

KALESNIKOFF, J.; GALLI, S. J. New developments in mast cell biology. **Nat Immunol**, v. 9, n. 11, p. 1215-23, Nov 2008. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18936782> >.

KAMAL, A. M.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100 Suppl 1, p. 39-47, Mar 2005. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15962097> >.

KAPONIS, A. et al. The role of NF-kappaB in endometriosis. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 4, p. 1213-34, 2012. ISSN 1945-0524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22652867> >.

KEMPURAJ, D. et al. Increased numbers of activated mast cells in endometriosis lesions positive for corticotropin-releasing hormone and urocortin. **Am J Reprod Immunol**, v. 52, n. 4, p. 267-75, Oct 2004. ISSN 1046-7408. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494048> >.

KHAU, T. et al. Annexin-1 signals mitogen-stimulated breast tumor cell proliferation by activation of the formyl peptide receptors (FPRs) 1 and 2. **FASEB J**, v. 25, n. 2, p. 483-96, Feb 2011. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20930115> >.

KHOUFACHE, K. et al. Anomalies in the inflammatory response in endometriosis and possible consequences: a review. **Minerva Endocrinol**, v. 37, n. 1, p. 75-92, Mar 2012. ISSN 0391-1977. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22382616> >.

KOIKE, H. et al. Correlation between dysmenorrheic severity and prostaglandin production in women with endometriosis. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 46, n. 2, p. 133-7, Jun 1992a. ISSN 0952-3278. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1502250> >.

_____. Eicosanoids production in endometriosis. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 45, n. 4, p. 313-7, Apr 1992b. ISSN 0952-3278. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1603821> >.

LEBOVIC, D. I.; MUELLER, M. D.; TAYLOR, R. N. Immunobiology of endometriosis. **Fertil Steril**, v. 75, n. 1, p. 1-10, Jan 2001. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163805> >.

LI, C. Y. et al. Expression of Annexin-1 in patients with endometriosis. **Chin Med J (Engl)**, v. 121, n. 10, p. 927-31, May 2008. ISSN 0366-6999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18706208> >.

LUNDEQUIST, A.; PEJLER, G. Biological implications of preformed mast cell mediators. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 6, p. 965-75, Mar 2011. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21069421> >.

MA, F. et al. Direct development of functionally mature tryptase/chymase double-positive connective tissue-type mast cells from primate embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 3, p. 706-14, Mar 2008. ISSN 1549-4918. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17991916> >.

MACCAGNANO, C. et al. Diagnosis and treatment of bladder endometriosis: state of the art. **Urol Int**, v. 89, n. 3, p. 249-58, 2012. ISSN 1423-0399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22813980> >.

MACDONALD, L. J. et al. A role for lipoxin A₄ as an anti-inflammatory mediator in the human endometrium. **Reproduction**, v. 142, n. 2, p. 345-52, Aug 2011. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21555360> >.

MAYBIN, J. A.; CRITCHLEY, H. O.; JABBOUR, H. N. Inflammatory pathways in endometrial disorders. **Mol Cell Endocrinol**, Aug 2010. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20723578> >.

MAYRAN, N. et al. Cellular and subcellular localizations of annexins I, IV, and VI in lung epithelia. **Am J Physiol**, v. 270, n. 5 Pt 1, p. L863-71, May 1996. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8967522> >.

MENZIES, F. M. et al. The role of mast cells and their mediators in reproduction, pregnancy and labour. **Hum Reprod Update**, Oct 2010. ISSN 1460-2369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20959350> >.

MIGEOTTE, I.; COMMUNI, D.; PARMENTIER, M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 17, n. 6, p. 501-19, Dec 2006. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17084101> >.

MULLA, A. et al. Expression, subcellular localization and phosphorylation status of annexins 1 and 5 in human pituitary adenomas and a growth hormone-secreting carcinoma. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 60, n. 1, p. 107-19, Jan 2004. ISSN 0300-0664. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14678296> >.

MUNKSGAARD, P. S.; BLAAKAER, J. The association between endometriosis and ovarian cancer: a review of histological, genetic and molecular alterations. **Gynecol Oncol**, v. 124, n. 1, p. 164-9, Jan 2012. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22032835> >.

NOURSHARGH, S.; HORDIJK, P. L.; SIXT, M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 5, p. 366-78, May 2010. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20414258> >.

OLIANI, S.; GIL, C. D. Proteína antiinflamatória anexina 1: mecanismos celulares e relevância clínica. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 13, n. 4, p. 215-220, 2006.

OLIANI, S. M. et al. An immunocytochemical and in situ hybridization analysis of annexin 1 expression in rat mast cells: modulation by inflammation and dexamethasone. **Lab Invest**, v. 80, n. 9, p. 1429-38, Sep 2000. ISSN 0023-6837. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11005211> >.

_____. Fluctuation of annexin-A1 positive mast cells in chronic granulomatous inflammation. **Inflamm Res**, v. 57, n. 10, p. 450-6, Oct 2008. ISSN 1023-3830. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18827967> >.

OLIANI, S. M.; DAMAZO, A. S.; PERRETTI, M. Annexin 1 localisation in tissue eosinophils as detected by electron microscopy. **Mediators Inflamm**, v. 11, n. 5, p. 287-92, Oct 2002. ISSN 0962-9351. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12467520> >.

OLIANI, S. M. et al. Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **Am J Pathol**, v. 158, n. 2, p. 603-15, Feb 2001a. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159197> >.

_____. Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **Am J Pathol**, v. 158, n. 2, p. 603-15, Feb 2001b. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159197> >.

OSTROWSKI, L. E. et al. A proteomic analysis of human cilia: identification of novel components. **Mol Cell Proteomics**, v. 1, n. 6, p. 451-65, Jun 2002. ISSN 1535-9476. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12169685> >.

OSUGA, Y. et al. Proteinase-activated receptors in the endometrium and endometriosis. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 4, p. 755-67, 2012. ISSN 1945-0508. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201911> >.

OZDEMIR, O. Mast cells and the tumor-associated neoangiogenesis. **Med Sci Monit**, v. 12, n. 6, p. LE9-11, Jun 2006. ISSN 1234-1010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16733492> >.

OZEL, L. et al. Abdominal wall endometriosis in the cesarean section surgical scar: a potential diagnostic pitfall. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 38, n. 3, p. 526-30, Mar 2012. ISSN 1447-0756. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22381104> >.

PAWELETZ, C. P. et al. Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma. **Cancer Res**, v. 60, n. 22, p. 6293-7, Nov 2000. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11103786> >.

PAŞALEGA, M. et al. Parietal abdominal endometriosis following Cesarean section. **Rom J Morphol Embryol**, v. 52, n. 1 Suppl, p. 503-8, 2011. ISSN 1220-0522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21424102> >.

PEJLER, G. et al. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. **Blood**, v. 115, n. 24, p. 4981-90, Jun 2010. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20233968> >.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 1, p. 62-70, Jan 2009. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19104500> >.

PERRETTI, M.; DALLI, J. Exploiting the Annexin A1 pathway for the development of novel anti-inflammatory therapeutics. **Br J Pharmacol**, v. 158, n. 4, p. 936-46, Oct 2009. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19845684> >.

PERRETTI, M.; GAVINS, F. N. Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. **News Physiol Sci**, v. 18, p. 60-4, Apr 2003. ISSN 0886-1714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644621> >.

PERRETTI, M. et al. Involvement of the receptor for formylated peptides in the in vivo anti-migratory actions of annexin 1 and its mimetics. **Am J Pathol**, v. 158, n. 6, p. 1969-73, Jun 2001. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11395373> >.

PODGAEC, S. et al. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. **Hum Reprod**, v. 22, n. 5, p. 1373-9, May 2007. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17234676> >.

POLINESS, A. E. et al. Proteomic approaches in endometriosis research. **Proteomics**, v. 4, n. 7, p. 1897-902, Jul 2004. ISSN 1615-9853. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15221746> >.

RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 13, p. 2631-9, Jun 2004. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15169834> >.

- RODRIGO TAPIA, J. P. et al. [Expression of annexins A1 and A2 in the mucosa of the upper air digestive tract]. **Acta Otorrinolaringol Esp**, v. 55, n. 7, p. 310-4, 2004 Aug-Sep 2004. ISSN 0001-6519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15554585> >.
- RODRIGUES-LISONI, F. C. et al. In vitro and in vivo studies on CCR10 regulation by Annexin A1. **FEBS Lett**, v. 580, n. 5, p. 1431-8, Feb 2006. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16460738> >.
- ROVIEZZO, F. et al. The annexin-1 knockout mouse: what it tells us about the inflammatory response. **J Physiol Pharmacol**, v. 53, n. 4 Pt 1, p. 541-53, Dec 2002. ISSN 0867-5910. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516535> >.
- SAMPEY, A. V.; HUTCHINSON, P.; MORAND, E. F. Annexin I surface binding sites and their regulation on human fibroblast-like synoviocytes. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 11, p. 2537-42, Nov 2000. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11083278> >.
- SCURRY, J.; WHITEHEAD, J.; HEALEY, M. Classification of ovarian endometriotic cysts. **Int J Gynecol Pathol**, v. 20, n. 2, p. 147-54, Apr 2001. ISSN 0277-1691. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11293160> >.
- SELVATICI, R. et al. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. **Eur J Pharmacol**, v. 534, n. 1-3, p. 1-11, Mar 2006. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16516193> >.
- SENA, A. A. et al. Spatial expression of two anti-inflammatory mediators, annexin 1 and galectin-1, in nasal polyposis. **Clin Exp Allergy**, v. 36, n. 10, p. 1260-7, Oct 2006. ISSN 0954-7894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17014434> >.
- SILISTINO-SOUZA, R. et al. Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. **Int J Cancer**, v. 120, n. 12, p. 2582-9, Jun 2007. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17340616> >.
- SOLITO, E. et al. Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. **Br J Pharmacol**, v. 133, n. 2, p. 217-28, May 2001. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11350857> >.
- STEAD, R. H. et al. Vagal influences over mast cells. **Auton Neurosci**, v. 125, n. 1-2, p. 53-61, Apr 2006. ISSN 1566-0702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16500155> >.
- TAGOE, C. E. et al. Annexin-1 mediates TNF-alpha-stimulated matrix metalloproteinase secretion from rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **J Immunol**, v. 181, n. 4, p. 2813-20, Aug 2008. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18684973> >.
- TAKAI, S.; JIN, D.; MIYAZAKI, M. Multiple mechanisms for the action of chymase inhibitors. **J Pharmacol Sci**, v. 118, n. 3, p. 311-6, 2012. ISSN 1347-8648. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22333480> >.
- TENG, C. C. et al. Abdominal wall endometriosis: an overlooked but possibly preventable complication. **Taiwan J Obstet Gynecol**, v. 47, n. 1, p. 42-8, Mar 2008. ISSN 1875-6263. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400581> >.
- TSAO, F. H.; CHEN, X.; TS'AO, C. H. Annexin I in female rabbit reproductive organs: varying levels in relation to maturity and pregnancy. **Lipids**, v. 30, n. 6, p. 507-11, Jun 1995. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7651077> >.
- VISHWANATHA, J. K. et al. Differential expression of annexins I and II in bovine bronchial epithelial cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 12, n. 3, p. 280-6, Mar 1995. ISSN 1044-1549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7873194> >.

WASIUK, A. et al. Mast cells as regulators of adaptive immunity to tumours. **Clin Exp Immunol**, v. 155, n. 2, p. 140-6, Feb 2009. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19077084> >.

WU, M. H. et al. Endometriosis: disease pathophysiology and the role of prostaglandins. **Expert Rev Mol Med**, v. 9, n. 2, p. 1-20, 2007. ISSN 1462-3994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17227592> >.

YANO, H. et al. Mast cell infiltration around gastric cancer cells correlates with tumor angiogenesis and metastasis. **Gastric Cancer**, v. 2, n. 1, p. 26-32, May 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11957067> >.

YAZID, S. et al. Anti-allergic drugs and the Annexin-A1 system. **Pharmacol Rep**, v. 62, n. 3, p. 511-7, 2010 May-Jun 2010. ISSN 1734-1140. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20631415> >.

YE, R. D. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. **Pharmacol Rev**, v. 61, n. 2, p. 119-61, Jun 2009. ISSN 1521-0081. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19498085> >.

ZHANG, J. et al. Mast cell regulation of human endometrial matrix metalloproteinases: A mechanism underlying menstruation. **Biol Reprod**, v. 59, n. 3, p. 693-703, Sep 1998. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9716571> >.

ZHANG, J.; SHI, G. P. Mast cells and metabolic syndrome. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 1, p. 14-20, Jan 2012. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21185370> >.

8. ANEXOS

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – FAMERP



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autoria Estadual – Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

Parecer n.º 101/2011

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo CEP n.º 1162/2011 sob a responsabilidade de **Cristiane Damas Gil** com o título "Imunopatologia da Endometriose: Análise dos Mastócitos e da expressão das proteínas Anexina-A1 e Galectina-3" está de acordo com a Resolução do CNS 196/96 e foi **aprovado por esse CEP**.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 27 de abril de 2011.



Prof. Dr. Fernando Batigália
Presidente do CEP/FAMERP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Imunopatologia da Endometriose: análise dos matócitos e da expressão das proteínas anexina A1 e galectina 3.

Para obter um maior conhecimento clínico e científico da endometriose, os médicos e pesquisadores desta Instituição estão desenvolvendo o projeto acima citado que deverá ajudar na obtenção de conhecimento sobre a doença e, conseqüentemente, de oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento para essa doença. O projeto envolve o estudo de material genético e proteínas obtidas de tumores de parede abdominal (endometriomas) removidos por cirurgia aberta (laparotomia) ou de biopsias de material biológico (útero) retirado de pacientes sem endometriose submetidas a histerectomia por outras causas.

Você está sendo atendida no Hospital de Base de São José do Rio Preto (FUNFARME) para o diagnóstico e/ou tratamento de endometriose de parede abdominal. Para isso, há a necessidade de remoção dos tecidos afetados pela doença. É nossa rotina encaminhar parte do material biológico para exames laboratoriais (anatomopatológico) importantes para o diagnóstico definitivo. O restante do material biológico que é retirado não é utilizado, sendo descartado conforme Legislação Sanitária que regulamenta o assunto. Se você concordar, a parte não utilizada do material biológico será armazenada para estudos sobre as proteínas citadas acima.

O material armazenado será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. A eventual publicação em revistas científicas dos resultados de pesquisa utilizando esse material será feita de modo a manter o anonimato dos participantes.

Se você concordar com o uso do material biológico do modo descrito acima, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa ou decidir retirar seu consentimento em qualquer momento, sua decisão não influenciará, de modo nenhum, o seu tratamento.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário. Somente assine este Termo se você consentir. Caso você tenha questões a fazer ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu

médico, por gentileza, entre em contato com o aluno de Mestrado, Pós-Graduação em Genética do Laboratório de Imunomorfologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista de São José do Rio Preto, Fone/Fax: (17) 3221-2200 (ramal 2731) - E-mail: rubens.de.paula.junior@hotmail.com, ou se tiver dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – CEP/FAMERP Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – Vila São Pedro – Fone/fax: (17) 32105700 (ramal 5813), São José do Rio Preto – SP.

Profª. Drª. Cristiane Damas Gil
Pesquisador Responsável pelo Projeto

DECLARAÇÃO

Declaro estar ciente das informações dadas, tendo lido atentamente e concordado com todo o teor do presente Termo.

São José do Rio Preto, de de 2011.

Responsável ou Paciente

Nome:

RG: