



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Carolina Zendron Machado Rudge

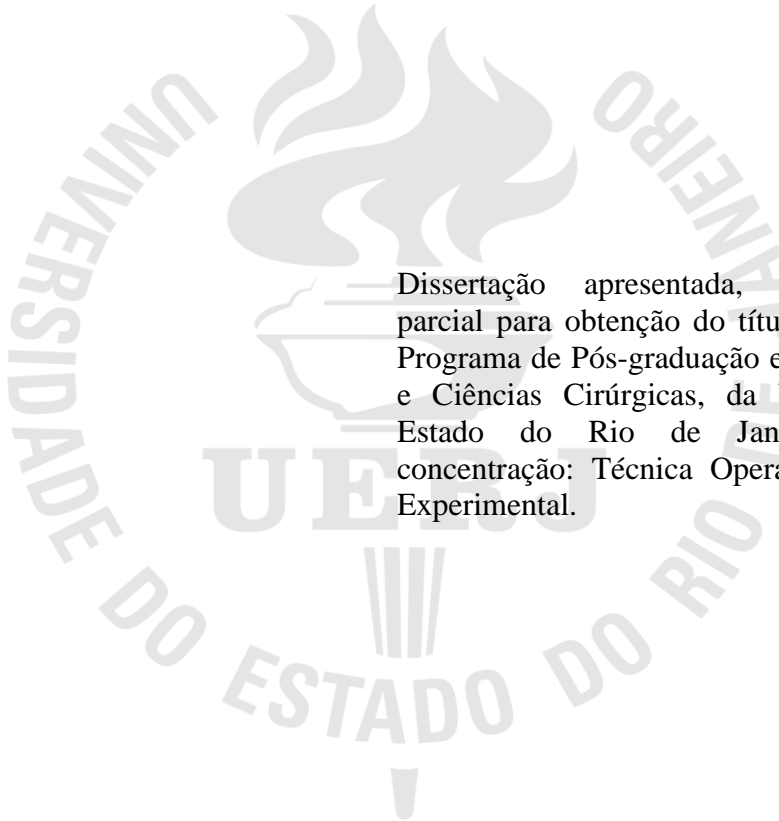
**Expressão da leptina e seus receptores no ovário humano normal e no
acometido por endometrioma**

Rio de Janeiro

2013

Carolina Zendron Machado Rudge

Expressão da leptina e seus receptores no ovário humano normal e no acometido por endometrioma



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Técnica Operatória e Cirurgia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Pinho de Oliveira

Coorientadora: Prof.^a Dra. Cristiane da Fonte Ramos

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R915 Rudge, Carolina Zendron Machado.
Expressão da leptina e seus receptores no ovário humano normal e no acometido por
endometrioma / Carolina Zendron Machado Rudge. - 2013.
84 f.

Orientador: Marco Aurélio Pinho de Oliveira.

Coorientadora: Cristiane da Fonte Ramos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de
Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Leptina - Teses. 2. Receptor de leptina. 3. Ovários - Teses. 4. Ovários -
Fisiopatologia. 5. Endometriose – Teses. I. Oliveira, Marco Aurélio Pinho de. II. Ramos,
Cristiane da Fonte. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências
Médicas. IV. Título.

CDU 618.11-006

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Carolina Zendron Machado Rudge

Expressão da leptina e seus receptores no ovário humano normal e no acometido por endometrioma

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas. Área de concentração: Técnica Operatória e Cirurgia Experimental.

Aprovada em: 30 de outubro de 2013.

Coorientadora:

Prof.^a Dra. Cristiane da Fonte Ramos
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marco Aurélio Pinho de Oliveira (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Leila Cristina Soares de Oliveira
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. José Carlos Jesus Conceição
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Carla Braga Mano Gallo
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo incentivo e apoio em todas as minhas decisões, e especialmente ao meu marido, um parceiro que a vida me deu.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me guia e conforta em todos os momentos.

Ao meu orientador, Marco Aurélio, não apenas pela orientação, mas por todo o ensinamento e pelas diversas oportunidades.

Aos meus colegas de profissão, Alessandra, Ana Luiza e Thiago com os quais aprendi e me diverti no centro cirúrgico e no ambulatório de endometriose.

À minha coorientadora, Cristiane, e aos amigos Fernanda, Helder e Verônica pela ajuda indispensável no laboratório e pelo carinho com que me receberam.

Aos colegas da Unidade de Pesquisa Urogenital e do LMMC que contribuíram esclarecendo dúvidas, oferecendo auxílio e tornaram o trabalho mais agradável e mais leve nos momentos difíceis.

A toda equipe do departamento de Ginecologia, professores, residentes e enfermeiras, por toda dedicação e respeito às pacientes e pela boa vontade de sempre.

Às pacientes, pois sem a participação delas, nada seria possível.

Tudo acontece na hora certa.

Tudo acontece, exatamente quando deve acontecer.

Albert Einstein

RESUMO

RUDGE, Carolina Zendron Machado. *Expressão da leptina e seus receptores no ovário humano normal e no acometido por endometrioma*. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Este estudo foi realizado para investigar os níveis de leptina no fluido de endometriomas ovarianos e comparar a expressão de leptina e seus receptores no tecido ovariano afetado por endometrioma de mulheres inférteis com a sua expressão no tecido ovariano normal de controles férteis sem endometriose. Neste estudo observacional, o tecido ovariano, amostras de sangue e fluido peritoneal foram obtidas de 20 mulheres (10 controles férteis sem endometriose ou qualquer doença ovariana, que foram submetidos à cirurgia de laqueadura tubária e 10 mulheres inférteis com endometriose grave endometrioma ovariano). O fluido contido no endometrioma ovariano foi aspirado, e biópsias de implantes peritoneais foram realizadas. Os tecidos removidos durante as cirurgias foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para determinação da expressão proteica por western blot e níveis de leptina pelo ELISA. A expressão do receptor de leptina foi maior no tecido do ovariano afetado por endometrioma que no tecido de ovariano normal (controle= $0,38 \pm 0,05$, estudo= $0,60 \pm 0,09$, $p= 0,03$), mas não houve diferença significativa nos níveis de leptina entre estes grupos (controle= $0,1 \pm 0,57$, estudo= $0,1 \pm 0,35$, $p= 0,18$). Foram observadas correlações positivas e significativas entre a leptina e seu receptor no endometrioma ovariano ($r = 0,85$, $p = 0,004$) e em implantes peritoneais ($r= 0,87$, $p= 0,001$). Os resultados do ELISA demonstraram uma maior concentração de leptina no fluido endometrioma em comparação com a leptina sérica e no fluido peritoneal (soro= $8,4 \pm 1,0$, FP= $1,6 \pm 0,5$, FE= $73,8 \pm 16,2$, $p= 0,0001$), mas não houve correlação entre estas variáveis. Observou-se uma correlação positiva, significativa e forte entre os níveis de leptina no fluido peritoneal e a expressão de leptina e seu receptor em implantes peritoneais (leptina: $r= 0,88$, $p= 0,0008$; OBR: $r= 0,96$, $p= 0,0001$) e entre os níveis de leptina no fluido endometrioma e a expressão da leptina e seu receptor no endometrioma ovariano (leptina: $r= 0,94$, $p= 0,001$; OBR: $r = 0,84$, $p= 0,02$). Nossos resultados sugerem que a leptina pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia do endometrioma ovariano por meio de uma interação moduladora com o seu receptor.

Palavras-chave: Leptina. Receptor de leptina. Ovário. Endometrioma ovariano. Fluido endometrioma. Endometriose.

ABSTRACT

RUDGE, Carolina Zendron Machado. *Expression of leptin and its receptors in normal human ovaries and in those affected by endometrioma*. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

This study was designed to investigate leptin levels in the fluid in ovarian endometriomas and to compare the expression of leptin and its receptors in ovarian tissue affected by endometrioma in infertile women to its expression in the normal ovarian tissue of fertile controls without endometriosis. In this observational study, ovarian tissue, blood samples and peritoneal fluid were obtained from 20 women (10 fertile controls without endometriosis or any ovarian disease, who were undergoing tubal ligation surgery, and 10 infertile women with severe endometriosis and ovarian endometrioma). The ovarian endometriomal fluid was aspirated, and peritoneal-implant biopsies were performed. The tissues removed during the surgeries were immediately frozen in liquid nitrogen to determine expression levels by western blot and leptin levels by ELISA. The leptin receptor was expressed at higher levels in the ovarian tissue affected by endometrioma than in the normal ovarian tissue (control= 0.38 ± 0.05 , study= 0.60 ± 0.09 , $p=0.03$), but there was no significant difference in leptin levels between these groups (control= 0.57 ± 0.1 , study= 0.35 ± 0.1 , $p=0.18$). Positive and significant correlations were observed between leptin and its receptor in the ovarian endometrioma ($r=0.85$, $p=0.004$) and in the peritoneal-implant ($r=0.87$, $p=0.001$). ELISA results demonstrate a greater leptin concentration within the endometrioma fluid compared with the serum and the peritoneal fluid (serum= 8.4 ± 1.0 , PF= 1.6 ± 0.5 , EF= 73.8 ± 16.2 , $p=0.0001$), but there was no correlation between these variables. A positive, significant and strong correlation was observed between peritoneal fluid leptin levels and the expression of leptin and its receptor in peritoneal-implant (leptin: $r=0.88$, $p=0.0008$; OBR: $r=0.96$, $p=0.0001$) and between the endometrioma fluid leptin levels and the expression of leptin and its receptor in the ovarian endometrioma (leptin: $r=0.94$, $p=0.001$; OBR: $r=0.84$, $p=0.02$). These data suggest that leptin may play an important role in the physiopathology of ovarian endometrioma through a modulatory interaction with its active receptor.

Keywords: Leptin. Leptin receptor. Ovary. Ovarian endometrioma. Endometriomal fluid. Endometriosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Modelo hipotético das relações entre a leptina e o eixo hipotálamo-hipófise-ovariano.....	12
Figura 2 –	Isoformas do receptor de leptina.....	13
Figura 3 –	Histologia do cortex ovariano	15
Figura 4 –	Apresentação macroscópica do endometrioma ovariano	18
Tabela 1 –	Características dos participantes.....	27
Figura 5 –	Fotomicrografia da cápsula do endometrioma.....	28
Figura 6 –	Expressão da leptina e seu receptor nos grupos controle e endometrioma.....	29
Figura 7 –	Expressão da leptina e seu receptor no grupo endometrioma.....	29
Figura 8 –	Correlação entre a expressão da leptina e seu receptor nos grupos controle e endometrioma.....	30
Figura 9 –	Níveis de leptina sérica e no fluido peritoneal nos grupos controle e endometrioma.....	31
Figura 10 –	Níveis de leptina sérica, no fluido peritoneal e no fluido endometrioma, no grupo endometrioma.....	32
Figura 11 –	Correlação entre os níveis de leptina sérica, no fluido peritoneal e no fluido endometrioma, no grupo endometrioma.....	33
Figura 12 –	Correlação entre a expressão da leptina e seu receptor com os níveis de leptina no fluido peritoneal no grupo endometrioma.....	34
Figura 13 –	Correlação entre a expressão da leptina e seu receptor com os níveis de leptina no fluido endometrioma, no grupo endometrioma.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPM	Erro padrão da média
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio de liberação das gonadotrofinas
HAM	Hormônio anti-mulleriano
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IMC	Índice de massa corpórea
kDa	Unidade de massa anatômica
LH	Hormônio luteinizante
OBR	Receptor de leptina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	ISOFORMAS DE RECEPTORES DE LEPTINA	13
2	OS OVÁRIOS	15
2.1	Os ovários e a leptina	17
3	O ENDOMETRIOMA OVARIANO E A ENDOMETRIOSE	18
3.1	O endometrioma, a endometriose e a leptina	21
4	OBJETIVO	23
5	MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1	Pacientes	24
5.2	Amostras de tecidos	24
5.3	Análise moleculare e bioquímica	25
5.3.1	<u>Western blotting</u>	25
5.3.2	<u>Determinação dos níveis de leptina</u>	26
5.4	Análise estatística	26
6	RESULTADOS	27
7	DISCUSSÃO	36
	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	APÊNDICE A - TCLE grupo controle	52
	APÊNDICE B – TCLE grupo endometrioma	53
	APÊNDICE C – Increased expression of the leptin receptor in human ovaries affected by endometrioma and detection of high levels of leptin in the ovarian endometriomal fluid (Artigo Científico)	54
	ANEXO – Comitê de Ética	83

INTRODUÇÃO

A leptina (do grego leptos = magro) é um hormônio peptídico com peso molecular de 16 kDa, formado por 167 aminoácidos [1], que apresenta uma estrutura terciária semelhante a alguns membros da família das citocinas. Esta proteína decodificada pelo gene obeso (ob) [2], localizado no braço longo do cromossoma 7 (7q31) [3], é predominantemente secretada pelos adipócitos, embora baixos níveis tenham sido detectados no hipotálamo [4], placenta [5], epitélio mamário [6], testículos [7], endométrio [8] e ovário [9].

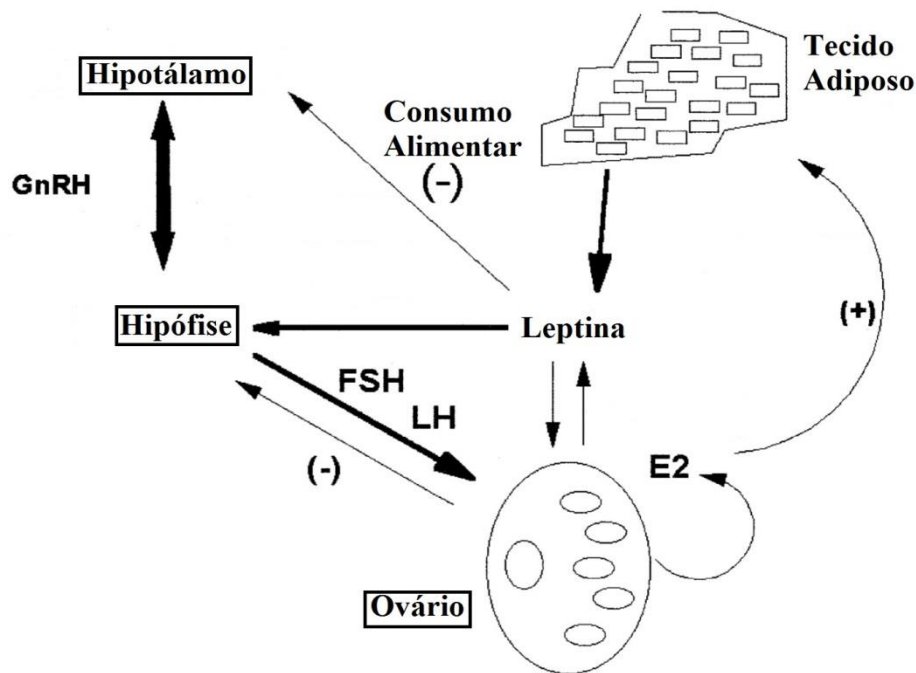
Pesquisas iniciais mostraram que a leptina circulante fornece ao cérebro informações referentes à quantidade de energia armazenada no tecido adiposo. Como ação principal controla o gasto energético e o consumo alimentar, através de uma cascata de eventos regulatórios disparados pela interação da leptina com seus receptores no hipotálamo.

Em um indivíduo com peso corporal normal, a leptina está mais correlacionada com a massa de gordura absoluta do que com o índice de massa corpórea (IMC) ou porcentagem de gordura corporal. Os níveis séricos de leptina aumentam proporcionalmente à massa de gordura corporal e parecem estar diretamente relacionados com a quantidade de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para leptina no tecido adiposo. Além disso, vários fatores metabólicos e endócrinos contribuem para regular a transcrição dos genes da leptina em adipócitos [10-12].

Além do envolvimento da leptina com o balanço energético, ingestão alimentar e controle do peso corporal, esta adipocina é crucial para a regulação de vários processos fisiológicos, incluindo a função reprodutiva, hematopoiese e inflamação, além de atividades imunorreguladoras e angiogênicas [13].

Diversos estudos demonstraram que os níveis de leptina sofrem uma flutuação fisiológica durante o ciclo menstrual, sendo sua concentração significativamente menor no início da fase folicular [14]. Dados sugerem que a leptina pode regular a função do eixo hormonal hipotálamo-hipófise-ovariano (figura 1) [15]. Acredita-se que esta proteína possa ser um sinal metabólico para o eixo reprodutivo em primatas, aumentando o nível plasmático de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) [16] e regulando a oscilação de LH e estradiol durante o ciclo menstrual [17]. O estradiol parece ter um importante papel na regulação da produção de leptina pelos adipócitos [18].

Figura 1- Modelo hipotético das relações entre a leptina e o eixo hipotálamo-hipófise-ovariano.



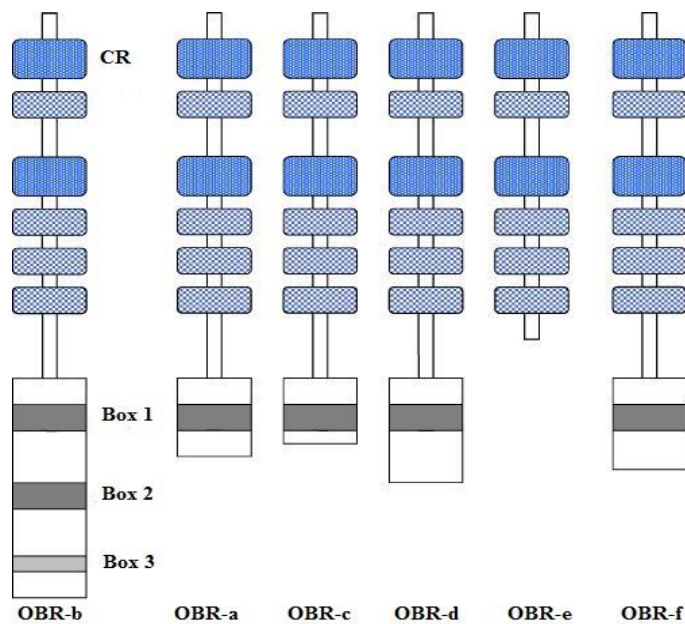
Fonte: Modificado de Gonzáles, et al 2000 [15].

Sabe-se que a quantidade de gordura corporal armazenada tem influência na fertilidade, indicando uma possível interação entre o tecido adiposo e o sistema reprodutivo [19]. Mulheres obesas, especialmente aquelas com obesidade central, apresentam maiores níveis de leptina circulante. Já mulheres atletas, portadoras de amenorreia hipotalâmica possuem deficiência de leptina [20]. Esses dois grupos de mulheres, obesas e atletas de alto nível, podem apresentar distúrbios reprodutivos, principalmente aqueles relacionados à ovulação. A administração de leptina recombinante no segundo grupo de pacientes resultou em crescimento folicular e ovulação, indicando que baixos níveis de leptina podem ser responsáveis pela disfunção reprodutiva que acompanha esta desordem neuroendócrina [21]. A deficiência de leptina assim como seu excesso está associada a anormalidades reprodutivas, tanto ao nível central quanto ao nível gonadal [22].

1. ISOFORMAS DE RECEPTORES DE LEPTINA

A leptina circula livremente ou ligada a proteínas específicas de ligação e possui seis diferentes isoformas de receptores (OBR): OBRb (receptor longo), OBRa, c, d, f (receptores curtos), e o OBRe (receptor solúvel) (figura 2). As isoformas curtas têm em comum o domínio extracelular constituído por mais de 800 aminoácidos, o domínio transmembrana de 34 aminoácidos e o domínio intracelular de 30-40 resíduos de aminoácidos, característico para cada uma das isoformas curtas. A isoforma longa diverge das demais por possuir domínio intracelular longo composto por aproximadamente 300 resíduos de aminoácidos, o que promove a interação com outras proteínas no citoplasma, ativando as vias de sinalização, sendo considerada a isoforma biologicamente funcional nos diferentes tecidos [10,23-25].

Figura 2 - Isoformas do receptor de leptina



Legenda: CR (domínio receptor de citocina); Box 1,2,3 (região de domínio intracelular). Modificado de Hegyi et al., 2004 [26].

A isoforma longa do receptor de leptina é expressa principalmente no hipotálamo [27] e responde às ações centrais desse peptídeo. Considerada a principal forma de sinalização do receptor [24/23], ela também está representada em muitos outros tipos celulares, tais como, cordão umbilical [28], intestino [29], placenta [30], queratinócitos localizados em margem de

lesão [31], estômago [32], osteoblastos [33], ácidos pancreáticos [34], ovário [35] e endométrio [8].

As isoformas curtas estão homogeneamente distribuídas por quase todos os tecidos periféricos, incluindo ovário, testículo e próstata [36]. Elas também são expressas nos rins e pulmões, sendo estes responsáveis pelo clearance de leptina na circulação [23]. OBRa e OBRc são amplamente expressas no plexo coroide e em micro vasos onde parecem ter um papel na captação ou no efluxo da leptina do líquido cefalorraquidiano, assim como no transporte mediado pelos receptores de leptina através da barreira hematoencefálica [37,38]. OBRe, que não tem domínio intracelular, está codificado como receptor solúvel [39], circula no sangue e possui alta afinidade de ligação com a leptina [40,41]. Assim, esta isoforma desempenha um papel na regulação dos níveis plasmáticos de leptina livre, a forma biologicamente ativa [42].

A semelhança com os membros da família das citocinas classe I, conhecidos por atuar através das proteínas JAK e STAT [43,44], forneceu pistas importantes para a descoberta dos possíveis mediadores intracelulares de ativação do receptor de leptina. Além da via JAK-STAT, atualmente sabe-se que a leptina é capaz de ativar a sinalização celular por outros mecanismos, sendo que a ativação da proteína fosfatidilinositol-3-kinase merece destaque por ser um ponto de convergência (*cross-talk*) entre a sinalização da leptina e da insulina. Essa ligação demonstra uma importante relação entre os dois hormônios, com destaque para a regulação hipotalâmica do peso corporal [26].

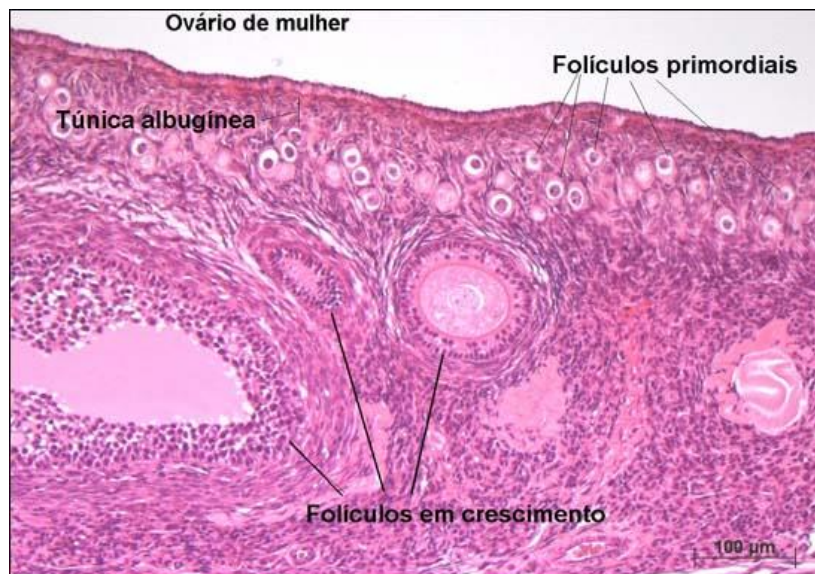
Inicialmente, ações diretas da leptina estavam relacionadas apenas ao sistema nervoso central. No entanto, a ampla distribuição das diferentes isoformas de receptores reflete a multiplicidade de efeitos biológicos em tecidos extra neurais, fornecendo evidências para a extrema funcionalidade da leptina [45].

2. OS OVÁRIOS

Os ovários são as gônadas femininas que têm origem de um processo passivo determinado pela ausência do cromossomo Y (sexo genético). Sua origem embrionária é o epitélio celômico para as células somáticas (granulosa e Teca) e o ectoderma primitivo para as células germinativas (ovócitos) [46]. São órgãos pares, em forma de amêndoa, medindo 3-4 cm de comprimento, localizados perto da fixação do ligamento largo nas paredes laterais da pelve, suspensos por pregas peritoneais. Fixam-se ao útero pelo ligamento útero-ovárico, estando suspensos na cavidade peritoneal e suas superfícies não são cobertas por peritônio [47].

O epitélio de superfície que reveste os ovários é uma modificação do peritônio chamada epitélio germinativo. Imediatamente abaixo está a túnica albugínea, uma cápsula de tecido conjuntivo denso e irregular [48]. O córtex ovariano é composto por um arcabouço de tecido conjuntivo, o estroma, folículos ovarianos em vários estágios de desenvolvimento e células do estroma semelhantes a fibroblastos (figura 3). A medula, região central do ovário, é composta por fibroblastos e contém grandes vasos sanguíneos, vasos linfáticos e fibras nervosas [48].

Figura 3 – Histologia do Córtex ovariano



Fonte: Retirado de <http://www.unifesp.br/dmorfo/histologia/ensino/ovario/histologia.htm> [49].

Além de funcionar como uma glândula endócrina responsável pela produção de esteroides sexuais (estrogênio e progesterona), os ovários também são responsáveis pelo desenvolvimento dos folículos imaturos até sua fase final de amadurecimento. São órgãos dinâmicos que nunca se encontram em repouso absoluto.

Os hormônios ovarianos são secretados pelos ovários em resposta a dois hormônios sexuais femininos da hipófise anterior, o FSH e o LH. Esses por sua vez, são secretados em resposta ao hormônio de liberação das gonadotrofinas (GnRH) do hipotálamo, e assim se constitui o eixo hormonal hipotálamo-hipófise-ovariano [50].

O desenvolvimento folicular é um processo dinâmico e contínuo que só se interrompe quando a reserva ovariana chega ao fim. O primeiro estágio do desenvolvimento folicular (folículo primordial) consiste em um ovócito paralisado no estágio diplóteno da prófase I meiótica, envolto por uma única camada de células da granulosa. Com a multiplicação das células da granulosa e a diferenciação das células do estroma em teca interna e teca externa temos o folículo primário, com duas ou mais camadas de células da granulosa e membrana basal. A partir do momento que o crescimento folicular passa a ser acelerado pelo FSH o folículo progride ao estágio pré-antral. Nesse estágio o ovócito é envolto pela zona pelúcida, que o separa das células da granulosa que estão em contínua proliferação mitótica. A influência sinérgica do estrogênio e do FSH promove um aumento na produção de líquido folicular, que se acumula nos espaços intercelulares da granulosa e forma uma cavidade, originando o folículo antral. As células da granulosa que circundam os ovócitos passam a ser chamadas de *cumulus ooforus*. A proliferação continuada das células da granulosa e formação contínua do líquido folicular resulta na formação de um folículo maduro (De Graaf), cujo diâmetro chega a 2,5 cm no momento da ovulação. Nessa fase o ovócito primário completa sua primeira divisão meiótica, o que resulta na formação do ovócito secundário e do primeiro corpo polar. Quando o ovócito secundário entra na segunda divisão meiótica, ocorre a ovulação e o restante do folículo maduro colapsa, com a formação do corpo lúteo [51].

A produção de estrogênio pelo folículo pré-antral e antral é explicada pela teoria das duas células duas gonadotrofinas. Os receptores para LH estão presentes apenas nas células da teca e os receptores para o FSH apenas nas células da granulosa. Em resposta ao LH, as células da teca são estimuladas a produzir androgênios, que são produzidos na teca a partir do colesterol. Os androgênios são transportados às células da granulosa e utilizados como substratos na produção de estrona e estradiol, através da aromatização induzida pelo FSH [50].

2.1 Os ovários e a leptina

A atuação da leptina no ovário começou a ser investigada quando sua presença bem como a presença do seu receptor foi detectada em ovários humanos [52]. A leptina é sintetizada nas células da granulosa e do *cumulus oophorus* de folículos humanos pré-ovulatórios [53]. Esta proteína também foi encontrada no fluido folicular sugerindo que ela pode induzir uma resposta biológica nas células ovarianas [35], de forma autócrina ou parácrina [9]. Ela ainda estimula a produção de estrogênio aumentando a expressão proteica RNAm P450arom e, conseqüentemente, a atividade da aromatase por sua ação direta sobre as células luteinizadas da granulosa [54].

Um estudo demonstrou uma diminuição significativa da leptina sérica em mulheres normais submetidas à ooforectomia bilateral, sugerindo que a produção ovariana de estradiol e progesterona pode participar do controle da produção de leptina durante o ciclo menstrual humano [55].

A expressão do receptor de leptina no ovário humano foi observada tanto no córtex quanto na medula e também nas células da granulosa, da teca e no corpo lúteo de ovários normais e policísticos [9]. Esses dados sugerem que a leptina deve agir diretamente no ovário humano, regulando sua função.

3. O ENDOMETRIOMA OVARIANO E A ENDOMETRIOSE

O endometrioma é uma forma de apresentação localizada da endometriose, uma doença caracterizada pela presença de implantes de estroma e/ou epitélio glandular endometrial em localização extrauterina [56]. Ele afeta principalmente os ovários e macroscopicamente apresenta-se como uma estrutura cística com conteúdo líquido espesso e achocolatado envolta por uma pseudocápsula cercado por áreas de fibrose (figura 4). Acomete 17-40% das mulheres com endometriose [57] e tanto a presença do endometrioma no tecido ovariano quanto a sua remoção cirúrgica, diminuem significativamente a reserva folicular ovariana, avaliada através da dosagem sérica do hormônio anti-mulleriano (HAM) [58].

Figura 4 – Apresentação macroscópica do endometrioma ovariano



Legenda: Foto de videolaparoscopia. A seta indica o conteúdo líquido espesso e achocolatado.

A presença do endometrioma isolado é rara. Na maioria dos casos ele está associado à endometriose infiltrativa profunda sendo um importante marcador de gravidade dessa doença [59]. Além do ovário, a endometriose pode acometer diversos locais, tais como peritônio, ligamento útero-sacro, região retro cervical, septo reto-vaginal, reto/sigmoide, íleo terminal, apêndice, bexiga e ureteres [60].

A extensão da doença varia de algumas pequenas lesões para grandes cistos ovarianos (endometriomas). Pode haver extensa fibrose em estruturas como os ligamentos útero-sacros

com formação de aderências densas causando distorção acentuada da anatomia pélvica. A American Society for Reproductive Medicine classifica a endometriose em mínima, leve, moderada e grave baseando-se no aspecto, tamanho e profundidade de implantes peritoneais e ovarianos; na presença, extensão e tipo de aderências; e no grau de obliteração do fundo de saco [61].

Estima-se que o número de mulheres com endometriose seja mais de 70 milhões no mundo [62]. O quadro clínico caracteriza-se por dismenorreia progressiva, dor pélvica, dispareunia profunda e sintomas intestinais e urinários cíclicos, como dor e/ou sangramento durante o período menstrual. Uma das principais causas de infertilidade, a endometriose tem uma prevalência de 0,5-5% em mulheres férteis e 25-40% em mulheres inférteis [63]. Trata-se de uma afecção ginecológica benigna, de etiologia complexa e multifatorial, com grande impacto na qualidade de vida [56], embora 20-25% das pacientes sejam assintomáticas [64].

O estabelecimento do diagnóstico de endometriose, com base nos sintomas isoladamente pode ser difícil porque a apresentação da doença é extremamente variável e existe sobreposição com outras condições, tais como a síndrome do intestino irritável e doença inflamatória pélvica. Como resultado, muitas vezes há um atraso de até 12 anos, entre o início dos sintomas e o diagnóstico definitivo [65].

Para o diagnóstico definitivo da endometriose a inspeção da cavidade pélvica pela videolaparoscopia com realização de biópsias é considerada o “padrão ouro” para a confirmação da doença. O marcador CA-125 pode estar elevado em pacientes com endometriose, principalmente em pacientes com doença avançada [66]. Comparando-se com a videolaparoscopia, o ultrassom não tem valor para o diagnóstico da endometriose peritoneal, mas pode ser uma ferramenta importante para excluir a endometriose ovariana (endometrioma) [67]. Até o momento as evidências são insuficientes para determinar se a Ressonância Magnética é um exame útil para diagnosticar ou excluir a endometriose, quando comparamos com a videolaparoscopia [68]. A ressonância magnética pode visualizar lesões adicionais inacessíveis à videolaparoscopia, sendo assim, a ressonância magnética da pelve deve ser utilizada no pré-operatório para o planejamento do tratamento cirúrgico [69].

O diagnóstico histológico de endometriose é realizado pelo achado de estroma endometrial, ou na sua ausência, de epitélio mulleriano com um pigmento subjacente, a hemossiderina [70]. A biópsia e o diagnóstico histológico (exame microscópico do tecido) confirmam o diagnóstico de endometriose; o exame negativo não exclui esta possibilidade [68].

A endometriose é considerada uma doença estrogênio-dependente, na qual a prevalência é maior em mulheres com menarca precoce e gestações tardias, situações onde temos uma maior exposição ao estrogênio. Já a prática de exercícios físicos e o tabagismo, onde há uma diminuição à exposição a este esteroide sexual, parecem ser protetoras [71].

A supressão do funcionamento ovariano por seis meses reduz a dor associada à endometriose, sendo considerada a principal forma de tratamento clínico da doença. As drogas hormonais disponíveis – pílulas anticoncepcionais, danazol, gestrinona, medroxiprogesterona e agonistas do GnRH são igualmente eficientes, mas diferem nos efeitos colaterais e no preço [68]. Embora o tratamento medicamentoso seja benéfico para o controle da dor ele não tem se provado eficaz para o tratamento da infertilidade associada à doença [72]. O tratamento cirúrgico da endometriose consiste na ablação e ressecção das lesões endometrióticas e tem se mostrado eficaz tanto para o controle da dor quanto para a melhora da infertilidade, aumentando as taxas de gravidez no pós-operatório [73].

Entre as diferentes modalidades terapêuticas, sabe-se que o tratamento clínico conservador do endometrioma é insuficiente por si só, independentemente do medicamento prescrito, podendo levar simplesmente a uma redução no volume, em vez de regressão completa do cisto [74]. A retirada do cisto endometriótico (cistectomia) com diâmetro maior que 4 cm melhora a fertilidade, quando comparamos ao aumento da recorrência da doença com a drenagem e cauterização do cisto [75]. A simples coagulação ou vaporização com laser do endometrioma sem a retirada da cápsula está associada ao aumento da recorrência da doença [76].

A busca pela etiopatogenia da endometriose é alvo de muitas pesquisas, tendo em vista que ao se entender o motivo do desenvolvimento do foco de endometriose, seria possível direcionar esforços para melhorar o diagnóstico e tratamento [77]. Embora a patogênese da endometriose ainda seja desconhecida, a teoria da menstruação retrógrada com a fixação de fragmentos endometriais (teoria da implantação) é a uma das mais aceitas. Um dos aspectos discutidos em relação a esta teoria é que, embora 70-90% das mulheres apresentem menstruação retrógrada, apenas uma minoria irá desenvolver a doença [78].

De acordo com a teoria da implantação a angiogênese é um pré-requisito fundamental para o desenvolvimento das fases iniciais e para a progressão da endometriose [79]. O endométrio ectópico tem uma maior capacidade de proliferar, implantar e crescer na cavidade peritoneal. Um aumento da expressão da integrina alfa3 (molécula de adesão celular) e da angiogênese endometrial foi observado em mulheres com endometriose quando comparadas com mulheres sem a doença [80]. A teoria imunológica propõe que citocinas e

fatores de crescimento estimulam a adesão e proliferação do endométrio ectópico e a angiogênese local [71].

Sendo assim, o que realmente parece contribuir para a formação e desenvolvimento de focos ectópicos de endometriose é uma combinação de fatores genéticos, imunológicos e hormonais [68]. Atualmente, grande parte das pesquisas em endometriose é fundamentada na capacidade do peritônio para reagir ao endométrio ectópico por meio de sua destruição e remoção. O fluido peritoneal das pacientes acometidas pela doença contém grande quantidade de macrófagos e leucócitos, além de diversas citocinas, com função imunorreguladoras, ativadora ou supressora, tais como: o fator de necrose tumoral [81], as interleucinas [82-84], o fator de crescimento endotelial vascular [85] e a leptina [86].

Evidências indicam que há produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e angiogênicos, tanto pelos leucócitos peritoneais quanto pelo tecido endometrial ectópico [86]

3.1 O endometrioma, a endometriose e a leptina

Devido suas propriedades angiogênicas e seu envolvimento na função reprodutiva, a leptina tem sido amplamente estudada em pacientes portadoras de endometriose. A expressão do seu receptor já foi descrita no endométrio humano [87], e pequenos estudos demonstraram a concentração aumentada desse hormônio no fluido peritoneal dessas pacientes [86]. Já os níveis séricos de leptina são semelhantes em mulheres com ou sem endometriose em qualquer estágio [88]. Há também um aumento significativo da expressão da leptina nos focos ectópicos de endometriose quando comparada com a sua expressão no endométrio tópico [89]. No entanto a forma longa do seu receptor encontra-se diminuída de acordo com o grau de severidade da doença [89].

A presença da leptina também já foi detectada no endometrioma ovariano [89]. O fluido peritoneal de pacientes com endometrioma superficial possui uma maior quantidade de leptina do que o de pacientes com endometrioma profundo [90]. Um único estudo demonstrou que a concentração de leptina no fluido peritoneal está aumentada em mulheres com endometriose peritoneal, mas não com endometrioma, sugerindo que diferentes mecanismos patogênicos estejam envolvidos no desenvolvimento dessas duas formas de apresentação da doença [91].

Embora haja um novo e importante papel para a leptina no endometrioma ovariano e no ovário humano, ainda não se sabe ao certo se este peptídeo está realmente envolvido na função reprodutiva deste órgão e se existe alguma correlação com o desenvolvimento do endometrioma ovariano e qual seria sua associação com a diminuição da reserva e da qualidade oocitária observada nessas pacientes e seu impacto na fertilidade.

4. OBJETIVO

Avaliar a expressão da leptina e seus receptores no tecido ovariano, os níveis de leptina sérica e no fluido peritoneal de mulheres inférteis portadoras de endometrioma ovariano comparando com sua expressão em mulheres férteis, sem evidência de endometriose ou outra doença ovariana. Serão investigados ainda os níveis de leptina no fluido contido no endometrioma e a expressão da leptina e seu receptor em implantes peritoneais de endometriose.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Pacientes

O grupo estudo (grupo endometrioma) consistiu em pacientes inférteis, submetidas à laparoscopia ou laparotomia por quadro de massa anexial sugestiva de endometrioma e infertilidade primária ou secundária há pelo menos um ano, com fator masculino normal. O grupo controle foi composto por pacientes férteis, submetidas à laqueadura tubária, sem evidência cirúrgica de endometriose ou outra doença ovariana. As cirurgias foram realizadas no período de dezembro de 2012 a abril de 2013 no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), Rio de Janeiro, e as pacientes foram selecionadas nos ambulatórios especializados em endometriose e planejamento familiar do mesmo hospital.

Todas as pacientes envolvidas no estudo estavam em idade reprodutiva e o IMC foi calculado através do peso pela altura ao quadrado, sendo incluídas apenas mulheres com IMC entre 20 e 30 Kg/m². Todas as pacientes estavam recebendo terapia hormonal combinada (estrogênio e progesterona) ou progestogênica isolada para o tratamento clínico da endometriose ou como método contraceptivo para as pacientes do grupo controle. O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de cada paciente antes da cirurgia e o projeto foi aprovado pelo comitê de ética do HUPE (anexo A).

Os critérios de exclusão foram: clínica e/ou imagem ultrassonográfica sugestiva de síndrome do ovário policístico, diabetes, doença hepática ou tireoidiana sistêmica, evidência cirúrgica de outra doença ovariana além do endometrioma.

5.2 Amostras de tecidos

Amostras de sangue foram obtidas no centro cirúrgico antes do início da anestesia. O fluido peritoneal foi aspirado do fundo de saco posterior no início das cirurgias. Uma biópsia em cunha do ovário intacto e sadio foi realizada nas pacientes do grupo controle. No grupo estudo, o líquido achocolatado (que chamaremos de “fluido endometrioma”) contido no interior do endometrioma foi aspirado. O endometrioma, propriamente dito, foi removido

através da técnica de cistectomia com retirada completa da pseudocápsula e de pequenos fragmentos de tecido ovariano poupado pelo endometrioma, sempre pelo mesmo cirurgião. Biópsias de implantes peritoneais também foram realizadas para diagnóstico histopatológico da endometriose e como dados para o estudo. A endometriose foi classificada de acordo com a normatização da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva de 1996 [62]. Uma parte de cada amostra foi enviada para o serviço de anatomia patológica do HUPE onde foi confirmada a presença de células do córtex ovariano nas amostras do endometrioma e a ausência de patologia nas amostras de ovário normal. Os tecidos utilizados no estudo foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados à -80°C .

5.3 Análises moleculares e bioquímicas

5.3.1 Western blotting

Cerca de quinhentos miligramas de tecido foram homogeneizados em 500 μL de tampão de lise contendo NP-40 a 1% (Amresco, Ohio, USA) e coquetel inibidor de protease (sigma), centrifugados a 9700 rpm a 4°C . A dosagem de proteína foi realizada por detecção fluorométrica (Qubit 2.0, Life Technologies Corporation, CA, USA). Alíquotas de 20 μg de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS a 8% e submetidas à eletroforese vertical (150 mA, 50 V, 1h30'), sendo então transferidas para membranas de nitrocelulose (80 mA, 4V, 1h30' para OBR ou 40' para leptina) em cuba semi-seca, as quais foram posteriormente incubadas com anticorpos específicos (Santa Cruz, CA, USA) para leptina (1:500) e OBR (1:200). A expressão das proteínas em estudo foi normalizada pela expressão de β -actina. A revelação das bandas foi realizada pelo método de quimiluminescência (ECL, Amersham BioSciences, PiCataway, NJ, USA), e fotodocumentada pelo sistema ChemiDoc MP System, Bio-Rad (Life Science Research USA). A quantificação de todas as bandas foi feita através de software Image J 1.42q, USA.

5.3.2 Determinação dos níveis de leptina

A concentração (ng/mL) de leptina presente no soro, no fluido peritoneal e no fluido do endometrioma foi determinada por ELISA (Millipore Corporation Billerica MA, USA). A leitura foi realizada por espectrofotometria seguindo as especificações do fabricante.

5.4 **Análises estatísticas**

Foi utilizado o programa Graphpad Prism (versão 6.0, Graphpad Software, CA, USA), onde os dados foram testados para a normalidade e homogeneidade de variâncias. Foi utilizado o teste t de student para comparação entre dois grupos e análise de variância univariada para comparação entre três grupos. Foi feita correlação de Pearson para correlação entre alguns parâmetros. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

Ambos os grupos foram compostos por 10 pacientes cada, com 10 amostras de tecido ovariano, fluido peritoneal e sangue. No grupo endometrioma foram obtidos ainda 10 amostras de implantes peritoneais de endometriose e 7 amostras de fluido do endometrioma. O fluido endometrioma das outras 3 pacientes do grupo estudo não foi incluído devido a ruptura do cisto antes da aspiração do seu conteúdo com contaminação do mesmo. A idade e o IMC das pacientes estão expressos como média \pm EPM na tabela 1. Todas as pacientes do grupo estudo foram classificadas como portadoras de endometriose estágio IV (severa) e tiveram como indicação cirúrgica infertilidade associada à massa anexial. No grupo controle todas as pacientes foram submetidas à cirurgia para laqueadura tubária. Um dos critérios de inclusão do estudo foi o uso de terapia hormonal, sendo que 80% das pacientes do grupo endometrioma e 60% do grupo controle estavam utilizando anticoncepcional oral combinado (estrogênio e progesterona), e o restante das pacientes estavam utilizando terapia progestogênica isolada.

Tabela 1 – Características dos participantes

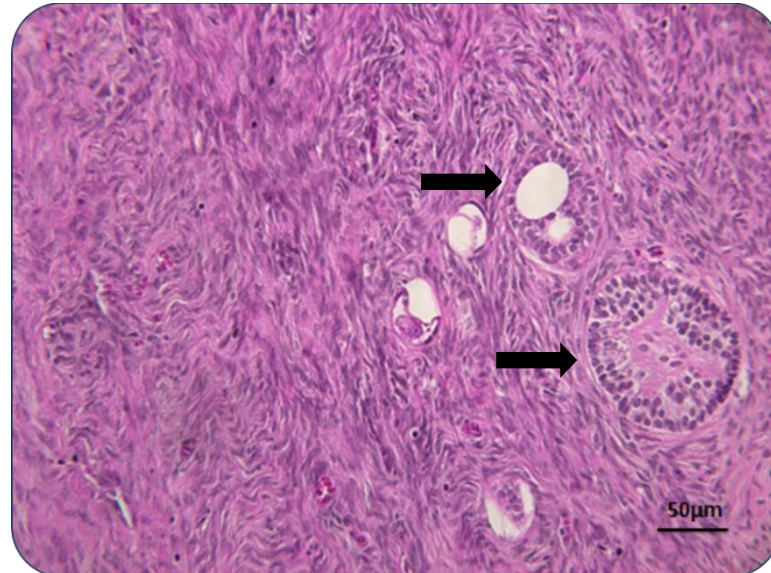
	Controle	Endometrioma
<i>Variáveis demográficas e antropométricas</i>		
N	10	10
Idade (anos)	31,5 +/- 1,63	34,67 +/- 2,01
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	24,83 +/- 3,19	25,9 +/- 3,22
<i>Classificação da doença</i>		
Estágio I (mínima)	-	0 (0)
Estágio II (leve)	-	0 (0)
Estágio III (moderada)	-	0 (0)
Estágio IV (severa)	-	10 (100)
<i>Terapia Hormonal</i>		
Estrogênio + Progesterona	6 (60)	8 (80)
Progesterona	4 (40)	2 (20)
<i>Indicação para cirurgia</i>		
Infertilidade + Massa anexial	-	10 (100)
Ligadura Tubária	10 (100)	-

Valores em parênteses estão em porcentagem

Idade e IMC estão expressos como média +/- EPM

A fotomicrografia do endometrioma demonstra a presença de células foliculares, confirmando a presença de tecido ovariano no endometrioma propriamente dito (figura 5).

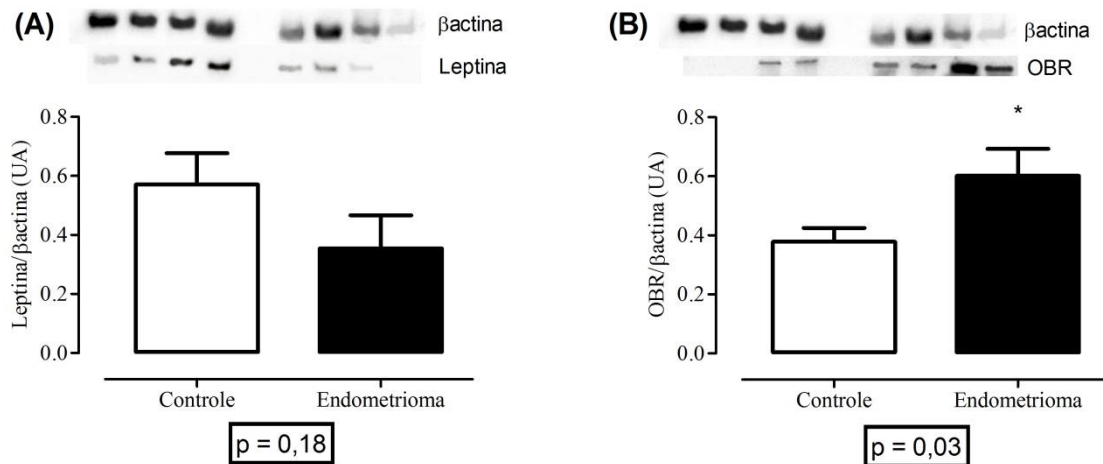
Figura 5 – Fotomicrografia do endometrioma



Lengenda: As setas indicam a presença de células foliculares. Coloração em hematoxilina-eosina e aumento de 100x.

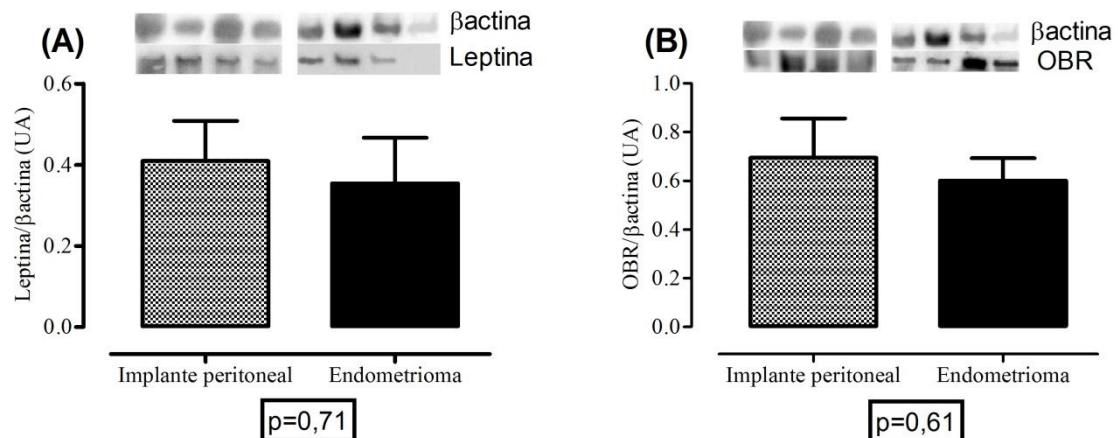
A análise da expressão proteica da leptina e de seu receptor realizada pela técnica de Western Blotting está expressa na figura 6. Observamos uma redução da expressão da leptina no grupo do endometrioma (controle= $0,57 \pm 0,12$, endometrioma= $0,35 \pm 0,13$, $p=0,18$). Em contrapartida, a expressão do seu receptor foi significativamente maior no mesmo grupo (controle= $0,38 \pm 0,05$, endometrioma= $0,60 \pm 0,09$, $p=0,03$). A figura 7 mostra a expressão da leptina (implante peritoneal= $0,41 \pm 0,09$, endometrioma= $0,35 \pm 0,11$, $p=0,71$) e do OBR (implante peritoneal= $0,69 \pm 0,16$, endometrioma= $0,60 \pm 0,09$, $p=0,61$) no grupo estudo, incluindo endometrioma e implante peritoneal, não sendo observada diferença estatística significativa entre esses dois diferentes focos de endometriose.

Figura 6 - Expressão da leptina e seu receptor nos grupos controle e endometrioma



Legenda: Expressão da leptina (A) e seu receptor (OBR; B) no grupo controle e no grupo endometrioma. Dados expressos como média +/- EPM, n=10/grupo.

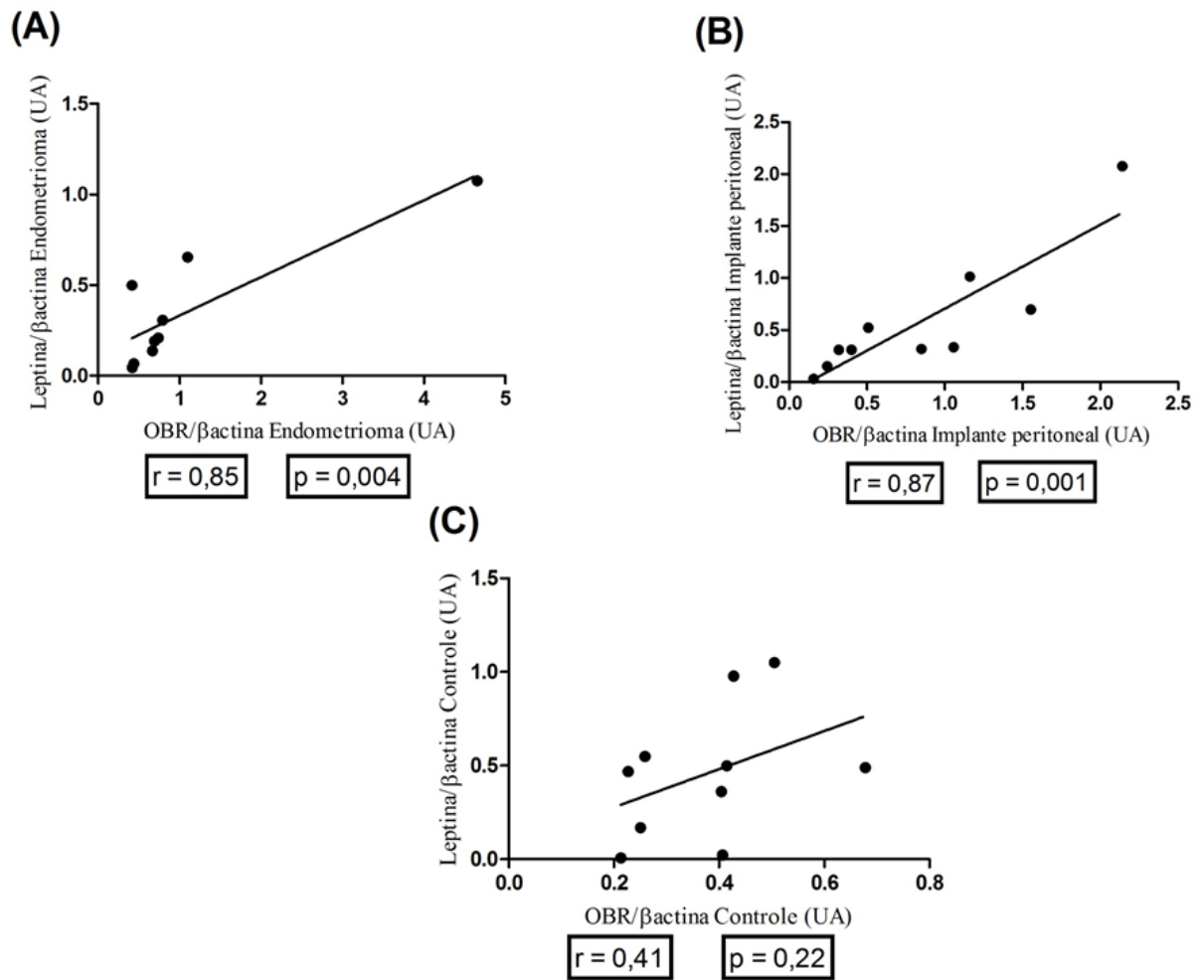
Figura 7 - Expressão da leptina e seu receptor no grupo endometrioma.



Legenda: Expressão da leptina (A) e seu receptor (OBR; B) no grupo endometrioma, incluindo implante peritoneal e endometrioma. Dados expressos como média +/- EPM, n=10/grupo.

Na figura 8 podemos observar as correlações entre a expressão da leptina e do OBR nos dois grupos. Enquanto no grupo estudo, leptina e OBR correlacionaram-se de maneira positiva, forte e significativa, tanto no endometrioma ($r=0,85$; $p=0,004$) quanto nos implantes peritoneais ($r=0,87$; $p=0,001$), no grupo controle, gráfico 3 (C), não houve correlação entre leptina e OBR ($r=0,41$; $p=0,22$).

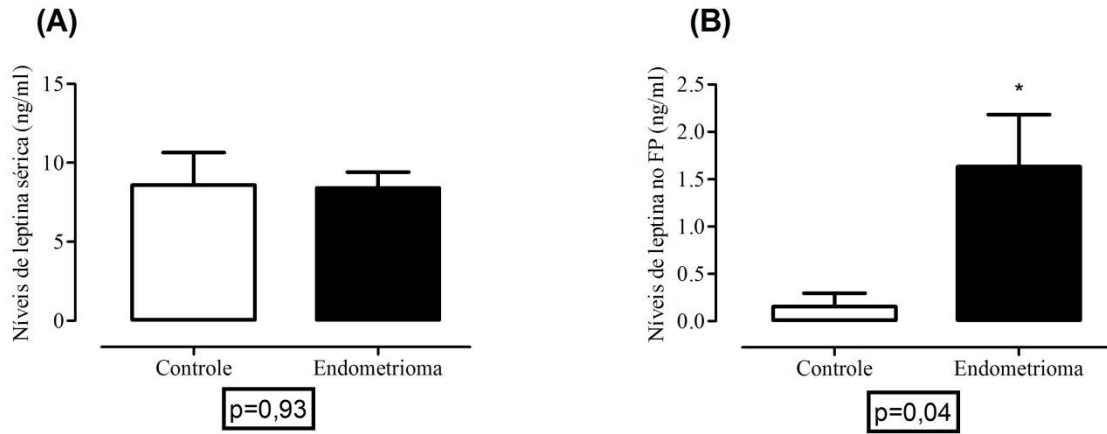
Figura 8 - Correlação entre a expressão da leptina e seu receptor nos grupos controle e endometrioma.



Legenda: Correlação de Pearson entre a leptina e seu receptor (OBR) no endometrioma (A) e implante peritoneal (B); e no grupo controle (C), $n=10$ /grupo.

A figura 9 mostra a diferença entre os níveis de leptina sérica e no fluido peritoneal no grupo endometrioma com relação ao grupo controle. Não houve diferença estatística entre os níveis de leptina sérica, figura 9 (A), no grupo endometrioma com relação ao controle (controle= $8,61 \pm 2,12$, endometrioma= $8,41 \pm 1,01$, $p=0,93$). Em contrapartida os níveis de leptina no fluido peritoneal, figura 9 (B), foram significativamente maior no grupo endometrioma (controle= $0,15 \pm 0,12$, endometrioma= $1,63 \pm 0,51$, $p=0,04$).

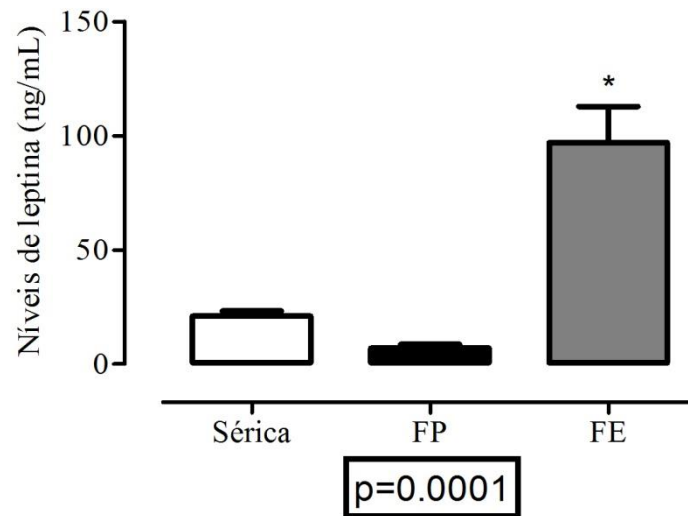
Figura 9 - Níveis de leptina sérica e no fluido peritoneal nos grupos controle e endometrioma.



Legenda: Níveis de leptina sérica (A) e no fluido peritoneal (FP; B) no grupo controle e no grupo endometrioma. Dados expressos como média \pm EPM, n=10/grupo.

Os níveis de leptina sérica, no fluido peritoneal e no fluido endometrioma no grupo endometrioma estão demonstrados na figura 10. Os níveis de leptina no fluido endometrioma foram significativamente maiores do que os níveis de leptina sérica e no fluido peritoneal (sérica=8,41 \pm 1,02, fluido peritoneal=1,62 \pm 0,51, fluido endometrioma=73,81 \pm 16,23, p=0,0001).

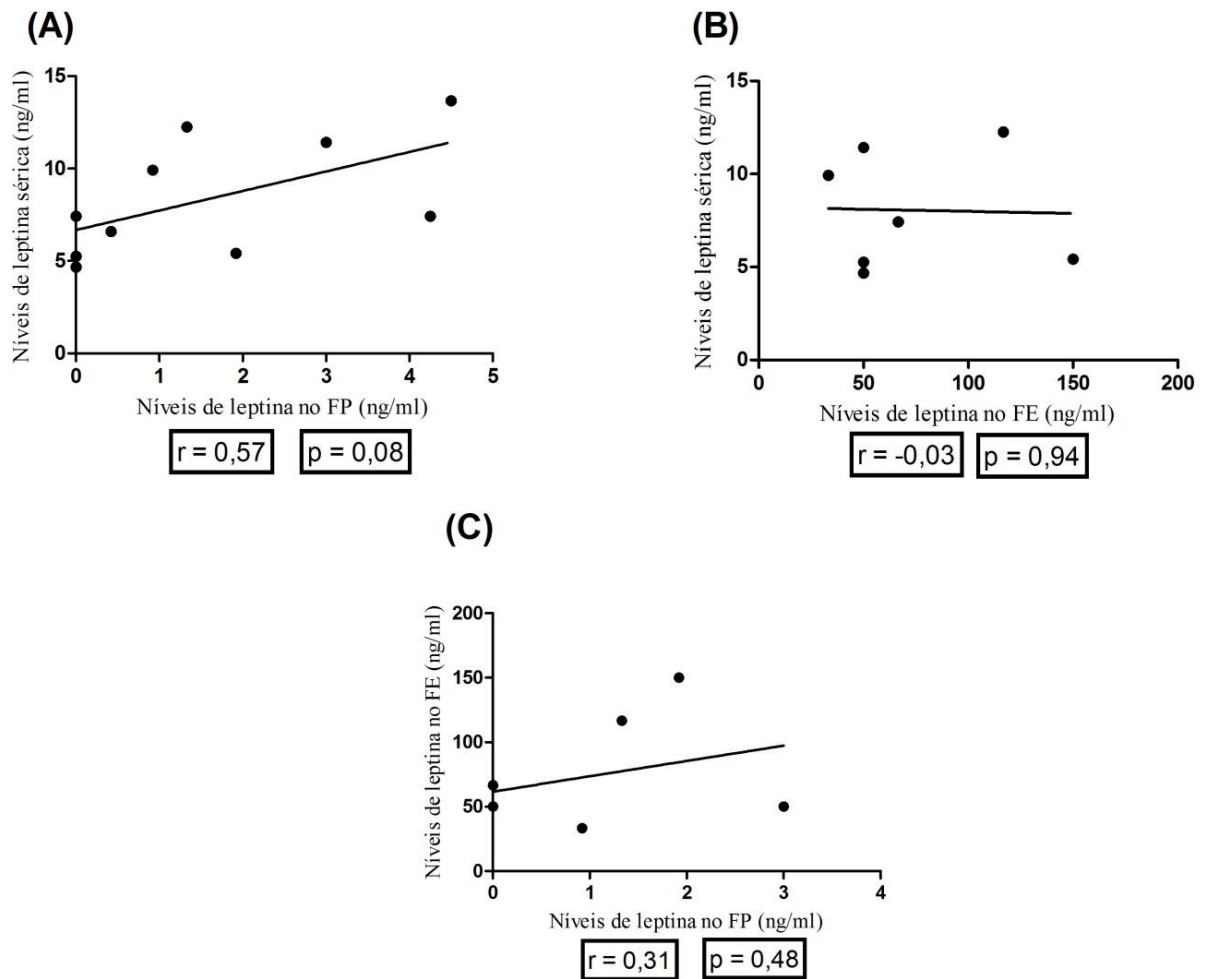
Figura 10 - Níveis de leptina sérica, no fluido peritoneal e no fluido endometrioma, no grupo endometrioma.



Legenda: Dados expressos como média +/- EPM, n=10/grupo sérica e fluido peritoneal (FP) e n=7/grupo fluido endometrioma (FE).

A figura 11 mostra as correlações entre os níveis de leptina sérica, no fluido peritoneal e no fluido endometrioma no grupo endometrioma. Na figura 11 (A) observamos uma correlação positiva, moderada e não significativa entre os níveis de leptina sérica e no fluido peritoneal ($r=0,57$, $p=0,08$). Entre os níveis de leptina sérica e no fluido endometrioma, figura 11 (B), a correlação é negativa, porém fraca e não significativa ($r=0,27$, $p=0,94$). Os níveis de leptina no fluido endometrioma e no fluido peritoneal estão representados na figura 11 (C) e a correlação mostrou-se fracamente positiva e não significativa ($r=0,32$, $p=0,48$).

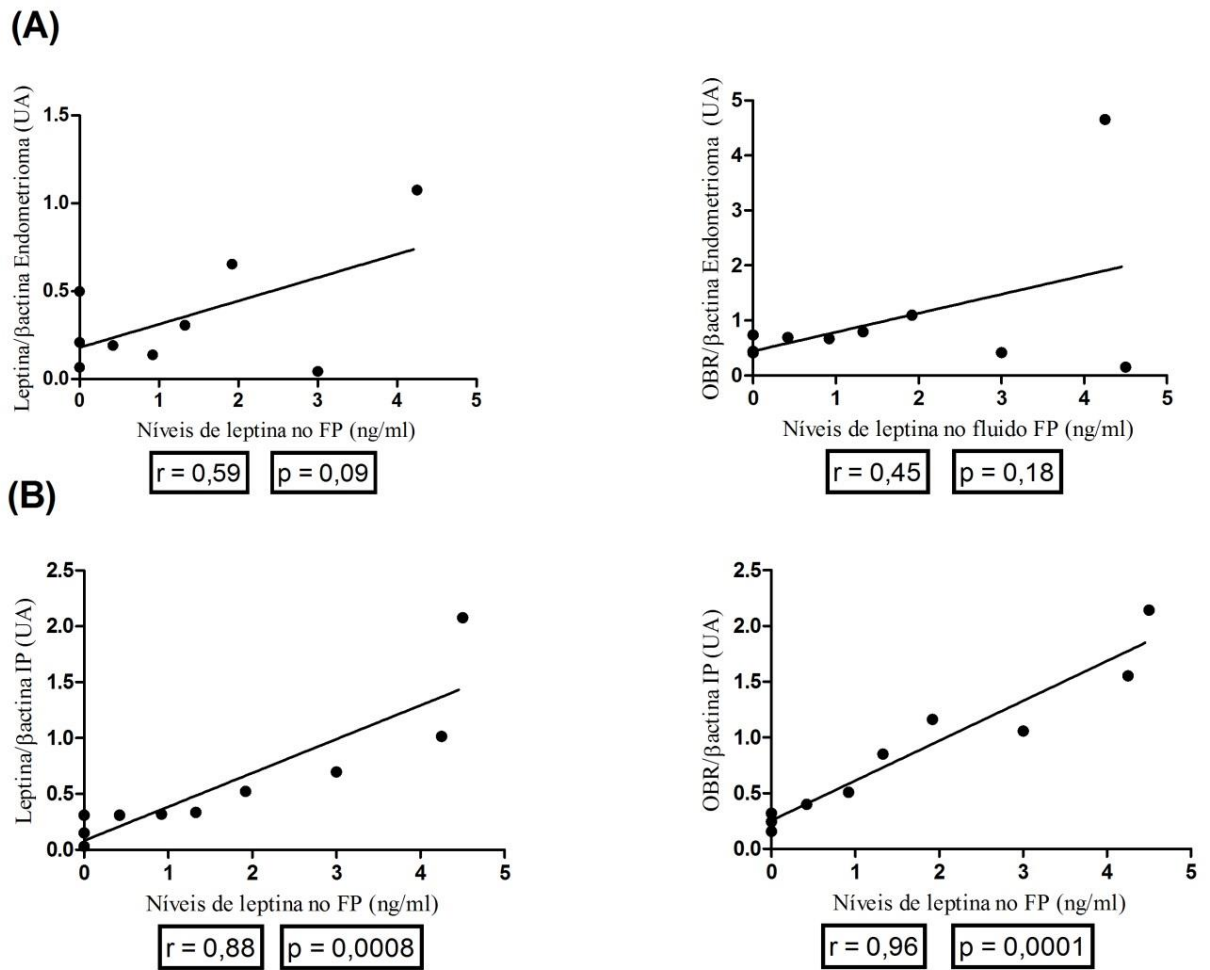
Figura 11 - Correlação entre os níveis de leptina sérica, no fluido peritoneal e no fluido endometrioma, no grupo endometrioma.



Legenda: Correlação de Pearson entre os níveis de leptina sérica e no fluido peritoneal (FP; A) n=10, leptina sérica e no fluido endometrioma (FE; B) n=7, e fluido endometrioma (FE) e fluido peritoneal (FP; C) n=7.

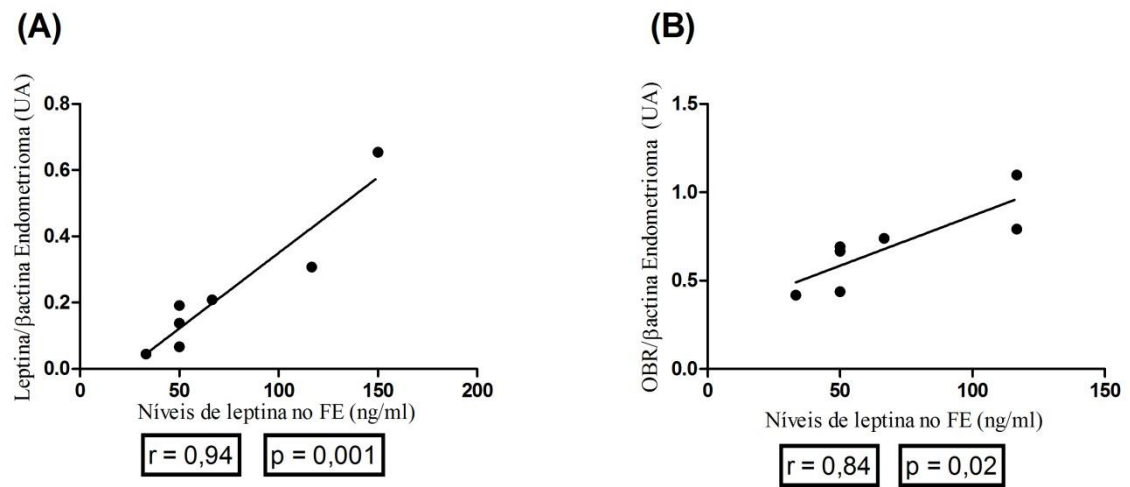
A correlação entre os níveis de leptina no fluido peritoneal e a expressão da leptina e OBR no tecido ovariano acometido pelo endometrioma foi positiva, mas não significativa (leptina: $r=0,67$, $p=0,04$ /OBR: $r=0,67$, $p=0,02$; figura 12 A), porém essa correlação foi positiva, significativa e forte para os implantes peritoneais (leptina: $r=0,88$, $p=0,0008$ /OBR: $r=0,96$, $p=0,001$; figura 12 B). Os níveis de leptina no fluido endometrioma correlacionaram-se fortemente e positivamente com a expressão da leptina e do OBR no endometrioma ovariano (leptina: $r=0,94$, $p=0,001$ /OBR: $r=0,84$, $p=0,02$; figura 13).

Figura 12 - Correlação entre a expressão da leptina e seu receptor com os níveis de leptina no fluido peritoneal no grupo endometrioma.



Legenda: Correlação de Pearson entre a expressão da leptina e do seu receptor (OBR) com os níveis de leptina no fluido peritoneal (FP) no grupo endometrioma, incluindo endometrioma (A) n=9 e implante peritoneal (IP; B) n=10.

Figura 13 - Correlação entre a expressão da leptina e seu receptor com os níveis de leptina no fluido endometrioma, no grupo endometrioma.



Legenda: Correlação de Pearson entre a expressão da leptina (A) e seu receptor (OBR; B) com os níveis de leptina no fluido endometrioma (FE), no grupo endometrioma, $n=7$.

7. DISCUSSÃO

Esse estudo teve como objetivo principal comparar a expressão da leptina e seu receptor no tecido ovariano normal e no acometido pelo endometrioma. Até o presente momento não encontramos estudos que tenham realizado esse tipo de comparação, uma vez que em todas as publicações o controle do endometrioma é o endométrio normal ou focos peritoneais de endometriose. Sendo assim, escolhemos o tecido ovariano normal como controle, pois estudos anteriores observaram que tecido ovariano saudável foi encontrado junto com a cápsula do endometrioma nas avaliações patológicas [92-93]. Quando achados patológicos de endometrioma e cistos não endometrióticos foram comparados, muito mais tecido ovariano foi encontrado em torno da parede do cisto nos grupos endometrioma [94]. Na verdade, na maioria dos casos o tecido ovariano é inadvertidamente retirado em conjunto com a parede do endometrioma, independente da técnica cirúrgica utilizada [95]. A experiência do cirurgião em cirurgia de endometriose é inversamente correlacionada com a remoção inadvertida de tecido ovariano saudável, juntamente com a cápsula do endometrioma [96]. Existe uma teoria de que o endometrioma é formado pela invaginação progressiva do córtex ovariano após o acúmulo de detritos menstrual que tenham derivado do derramamento de um implante ativo de endometriose superficial [97]. De acordo com esta afirmação, o endometrioma é um cisto falso e a sua parede é o mesmo que o córtex ovariano [98], o que justifica a escolha do nosso grupo controle.

No presente estudo o endometrioma foi removido através da técnica de cistectomia, sempre pelo mesmo cirurgião e parte das amostras foi enviada para análise histopatológica, para garantir a presença dos dois tipos de tecidos, glândula e/ou estroma endometrial e tecido ovariano, como mostrado nos resultados em uma coloração de hematoxilina eosina. Estudos prospectivos e retrospectivos previamente publicados mostram que a cistectomia é superior às demais técnicas em termos de risco de recorrências dos sintomas, reoperação do cisto e gravidez [98] e um ensaio clínico mostrou que a diminuição dos níveis séricos de HAM após a cirurgia não foi significativa [99].

Um dos critérios de inclusão desse estudo foi o uso de contraceptivos hormonais. Esse critério foi estabelecido, pois a grande maioria das pacientes estava recebendo terapia hormonal para o tratamento clínico da endometriose ou como método contraceptivo, no caso do grupo controle. Além de contribuir para a homogeneidade dos grupos, o uso da terapia hormonal, provocou o bloqueio do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano durante todo o ciclo,

mantendo os ovários em repouso, imunes às flutuações hormonais cíclicas. Dados da literatura mostram que a leptina não é influenciada pelo uso de contraceptivos orais, indicando que estrogênio e progesterona não influenciam a concentração sérica periférica de leptina [100]. Além disso, não houve alteração da leptina sérica em amostras coletadas em diferentes tempos de tratamento cíclico com contraceptivo oral e não houve diferença significativa nas médias de concentrações de leptina entre mulheres que usam contraceptivos orais e mulheres sem terapia hormonal [100].

Outro critério de inclusão foi o estabelecimento do IMC entre 20 e 30 Kg/m², que inclui pacientes normais e com sobrepeso, sendo observada uma predominância de mulheres com IMC normal. Sabe-se que os níveis séricos de leptina aumentam em proporção ao IMC e sabe-se que a endometriose tem uma predominância em mulheres magras. Os resultados de um grande estudo prospectivo, com dados coletados do “Estudo da saúde das enfermeiras II”, sugerem que a endometriose associa-se inversamente com o IMC atual e principalmente com o IMC do início da idade adulta (18 anos), e pode também se correlacionar com a distribuição de gordura corporal periférica [101]. A magnitude das duas relações foi mais forte no subconjunto de mulheres com infertilidade. Nossos resultados não mostraram diferença entre os níveis de leptina sérica no grupo de mulheres férteis e sem endometriose, e no grupo de mulheres inférteis e com endometriose profunda, mesmo havendo nos dois grupos mulheres com IMC normal e sobrepeso.

Observamos que a expressão proteica do OBR é maior no tecido ovariano afetado pelo endometrioma de pacientes inférteis e portadoras de endometriose profunda, do que no tecido ovariano normal de controles férteis e sem endometriose, porém para a leptina não houve diferença entre os dois grupos. Com isso podemos sugerir que o endometrioma é mais responsivo a ação da leptina do que o tecido ovariano normal, pela maior expressão do seu receptor. O fato da expressão proteica da leptina estar ligeiramente diminuída no tecido ovariano acometido pelo endometrioma pode ser explicado pela descoberta de altos níveis de leptina no fluido endometrioma, ou seja, essa proteína poderia estar sendo secretada para o interior da cápsula do endometrioma, estando difusa no seu líquido achocolatado (fluido endometrioma), não permanecendo no tecido endometriótico propriamente dito. Recentemente a expressão da leptina e do OBR no endometrioma foi comparada com sua expressão no endométrio normal, sendo significativamente maior no primeiro grupo, sugerindo, que implantes de endometriose são tanto uma potencial fonte de produção de leptina quanto um alvo em potencial [102].

Nossos resultados mostraram que não houve diferença entre a expressão da leptina e do OBR em implantes peritoneais e no endometrioma. Dados na literatura mostram que implantes peritoneais de endometriose apresentam um aumento da expressão de leptina e OBR quando comparados ao endométrio eutópico e nesse caso leptina e OBR correlacionam-se positivamente [103]. Utilizando a mesma análise molecular por nós realizada, outro estudo demonstrou a expressão gênica e proteica da leptina tanto no endometrioma ovariano quanto em implantes peritoneais, e de acordo com os nossos resultados, a quantidade de leptina não foi diferente nesses dois grupos, porém foi maior do que no endométrio eutópico normal [89].

Este mesmo estudo também observou que a expressão do OBR se correlacionou inversamente com a expressão da leptina no tecido endometrial ectópico, ou seja, o aumento da leptina provocou uma supressão do seu receptor, evidenciando um possível efeito de “*down regulation*” da leptina sobre seu próprio receptor. Diferente desse estudo nossos resultados mostraram uma correlação fortemente positiva entre leptina e OBR tanto no endometrioma ovariano, quanto nos implantes peritoneais, porém essa correlação não foi observada no tecido ovariano normal. De acordo com os nossos resultados, Nacul et al, também observou uma correlação significativa entre leptina e OBR em implantes peritoneais [103] e embora a diferença não foi estatisticamente significativa, dados anteriores mostraram uma correlação positiva, porém modesta entre a expressão da leptina e do OBR em endometriomas ovarianos [102]. Além disso, esses mesmos autores demonstraram que o tratamento com leptina induz a expressão de OBR em células endometrióticas.

A endometriose além de ser uma doença inflamatória é também uma doença que depende da neoangiogênese para o seu desenvolvimento inicial e manutenção. A leptina demonstrou ter um importante papel tanto na inflamação [104] quanto na neoangiogênese [105] e o achado dessa proteína e do seu receptor no endometrioma ovariano, indica que ela pode estar de alguma forma estimulando o seu desenvolvimento. Dados sugerem que as ações pró-inflamatórias e neoangiogênicas da leptina podem contribuir para a patogênese da endometriose [86]. Um estudo utilizando um modelo murino de endometriose mostrou que a sinalização da leptina é um componente necessário para a proliferação da lesão, recrutamento vascular precoce, e manutenção da neoangiogênese da endometriose e que a ruptura da sinalização da leptina prejudica o estabelecimento de lesões semelhantes à endometriose [106]. Além disso, já foi relatado que a leptina estimula o crescimento de células epiteliais endometrióticas através das vias JAK2/STAT3 e ERK [107].

Transtornos relacionados com a deficiência ou excesso de leptina e superabundância leptina motivou o desenvolvimento de fármacos que ativam ou inibem o OBR [108]. Em uma

solicitação de patente encontramos a descoberta de um peptídeo capaz de impedir a sinalização do OBR em células responsivas a leptina [109]. Esse peptídeo liga-se ao receptor, porém não ativa sua via de sinalização, agindo com um antagonista do OBR. O desenvolvimento de uma leptina mutante com propriedades antagonistas e outras proteínas que bloqueiam a atividade da leptina poderá abrir novas possibilidades para a pesquisa [110] e, eventualmente, para o tratamento clínico do endometrioma ovariano, a forma de apresentação da endometriose que pior responde aos tratamentos clínicos disponíveis, tendo que ser abordada cirurgicamente na maioria dos casos.

Nossos resultados também observaram a expressão da leptina e do OBR no ovário normal. A expressão do OBR e da leptina foi evidenciada em diversas regiões do ovário humano normal e um aumento da produção local de leptina foi identificado em ovários policísticos [9]. Esses autores acreditam que a concentração localizada e aumentada de leptina poderia causar uma anormalidade no sistema de controle do FSH e na produção de hormônios esteroides pelas células da granulosa. Outro estudo além de reportar a presença do OBR no ovário humano e da leptina no fluido folicular, sugere que a leptina pode induzir uma reposta biológica nas células ovarianas, podendo exercer um efeito direto nessa gônada [35]. No caso do endometrioma, encontramos uma discreta diminuição na concentração local de leptina, sendo praticamente a mesma do grupo controle. Como já mencionado esse dado pode ser explicado pela secreção de leptina para o fluido endometrial ou para o fluido endometrioma. Outra hipótese é que o uso de contraceptivos hormonais por todas as pacientes possa ter contribuído pela pequena diferença entre as concentrações proteicas locais de leptina nos dois grupos.

Em mulheres inférteis e portadoras de endometriose os níveis de leptina no fluido peritoneal foram significativamente maiores do que em pacientes com dor pélvica e portadoras de endometriose [111] e também do que em pacientes com infertilidade sem causa aparente [112]. Um estudo que comparou mulheres com diferentes causas de infertilidade primária (endometriose, SOP, ESCA e obstrução tubária bilateral) os níveis de leptina no fluido peritoneal foi superior nas pacientes com endometriose em comparação com os outros três grupos [113]. Em nosso estudo também demonstramos um aumento dos níveis de leptina no fluido peritoneal de pacientes inférteis e com endometriose profunda e endometrioma ovariano, quando comparadas com pacientes férteis e sem endometriose.

Diversos estudos observaram um aumento da leptina no fluido peritoneal de pacientes com endometriose mostrando concentrações elevadas de leptina no líquido peritoneal de pacientes com endometriose peritoneal em qualquer estágio [91]. Em contrapartida outro

relato evidenciou que os níveis de leptina foram mais altos nos estágios iniciais do que na doença em estágio avançado [86] fazendo com que exista uma correlação inversa entre os níveis de leptina no fluido peritoneal e a extensão da doença. Nossos resultados mostram um aumento dos níveis de leptina no fluido peritoneal de pacientes portadoras de endometriose, e cabe aqui lembrar que todas as pacientes eram portadoras de endometriose estágio IV e endometrioma ovariano.

Uma questão levantada em alguns trabalhos é sobre a origem da leptina livre no fluido peritoneal. Um estudo em particular mostrou que pacientes com endometriomas "superficiais" apresentaram níveis significativamente mais altos de leptina no líquido peritoneal em comparação com pacientes portadoras de endometriomas "profundos", excluindo pacientes com evidência de lesões típicas de endometriose peritoneal [90]. Apesar desse critério de exclusão, sabemos que muitas lesões endometrióticas podem não ser visualizadas durante as cirurgias, principalmente lesões diafragmáticas, em alças intestinais ou lesões peritoneais atípicas, não pigmentadas que não são visualizadas a olho nu [114-115]. Sendo assim, esse autor não poderia afirmar que a origem da leptina presente no líquido peritoneal é o endometrioma ovariano. Outro estudo mostrou que a presença do endometrioma ovariano não teve um efeito significativo sobre as concentrações de leptina no fluido peritoneal, sugerindo que a presença dos implantes peritoneais e não do endometrioma, é o fator que influencia a concentração de leptina no fluido peritoneal dessas pacientes [91]. Um achado interessante no presente estudo foi a correlação positiva entre os níveis de leptina no fluido peritoneal e a expressão de leptina e OBR nos implantes peritoneais, correlação esta não observada com o endometrioma ovariano. Em contraste, a expressão de leptina e do seu receptor no endometrioma se correlacionou de forma forte e positiva com os níveis de leptina no fluido endometrioma. Essas correlações positivas e significativas sugerem que OBR pode ser induzido em endometriomas ovarianos e em implantes peritoneais pelos níveis de leptina no fluido endometrioma e no fluido peritoneal, respectivamente.

Dados previamente publicados levantaram a hipótese de que a leptina do fluido peritoneal poderia estar sendo sequestrada para o interior do endometrioma, principalmente pelos achados de menores concentrações de leptina no fluido peritoneal em pacientes portadoras de endometrioma ovariano [89,91]. Apesar dos nossos resultados mostrarem que leptina no fluido endometrioma está aumentada em relação à leptina no fluido peritoneal, esse dados não se correlacionaram. Sendo assim, acreditamos que a leptina no fluido peritoneal seja regulada por focos peritoneais de endometriose e que a leptina contida no interior no líquido achocolatado seja regulada pelo próprio endometrioma, não havendo uma troca de

leptina entre esses dois compartimentos. Apesar das diversas hipóteses, concordamos com a conclusão de que essas duas formas de apresentação da endometriose (peritoneal e ovariana) poderiam ter diferentes mecanismos patogênicos e diferentes capacidades de síntese de leptina [91].

Após constatar a presença de grandes quantidades de leptina no interior do endometrioma, nos resta saber se este fator inflamatório pode estar contribuindo tanto para a diminuição da reserva oocitária quanto para a piora da qualidade oocitária do ovário por ele acometido. Um estudo prospectivo mostrou que concentrações intra-ovarianas elevadas de leptina foram associadas com menor resposta a estimulação ovariana, maturação folicular, capacidade oocitária, qualidade embrionária e taxa de gravidez [116].

Nossos resultados mostram uma maior expressão de OBR no tecido ovariano acometido pelo endometrioma do que no tecido ovariano normal, níveis elevados de leptina no fluido endometrioma comparado aos níveis no fluido peritoneal e uma correlação positiva e significativa entre leptina e OBR. Esses dados sugerem que a leptina pode ter um importante papel na fisiopatologia do endometrioma ovariano através de uma interação moduladora com o seu receptor.

CONCLUSÃO

- Não houve diferença entre a expressão da leptina no tecido ovariano acometido pelo endometrioma de mulheres inférteis e no tecido ovariano normal de mulheres férteis.

- A expressão do receptor de leptina é significativamente maior no tecido ovariano acometido pelo endometrioma de mulheres inférteis do que no tecido ovariano normal de mulheres férteis.

- Os níveis de leptina no fluido endometrioma são significativamente maiores quando comparado aos níveis de leptina sérica e no fluido peritoneal.

- Não houve diferença entre a expressão da leptina e seu receptor no endometrioma ovariano e em implantes peritoneais de endometriose.

REFERÊNCIAS

- [1] Gong DW, Bi S, Pratley RE, Weintraub BD. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem.* 1996 Feb 23;271(8):3971-4.
- [2] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994 Dec 1;372(6505):425-32.
- [3] Green ED, Maffei M, Braden VV, Proenca R, DeSilva U, Zhang Y *et al.* The human obese (ob) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res.* 1995 Aug;5(1):5-12.
- [4] Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E. Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology.* 1999 Dec;140(12):5995-8.
- [5] Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H *et al.* Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med.* 1997 Sep;3(9):1029-33.
- [6] Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, De Johnston J, Lancey ED, Hassink SG, Funanage VL. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 May;83(5):1810-3.
- [7] Caprio M, Isidori AM, Carta AR, Moretti C, Dufau ML, Fabbri A. Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology.* 1999 Nov;140(11):4939-47.
- [8] Kitawaki J, Koshihara H, Ishihara H, Kusuki I, Tsukamoto K, Honjo H. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 May;85(5):1946-50.
- [9] Löffler S, Aust G, Köhler U, Spanel-Borowski K. Evidence of leptin expression in normal and polycystic human ovaries. *Mol Hum Reprod.* 2001 Dec;7(12):1143-9.
- [10] Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000 Oct;11(8):327-32.
- [11] Hickey MS, Houmard JA, Considine RV, Tyndall GL, Midgette JB, Gavigan KE *et al.* Gender-dependent effects of exercise training on serum leptin levels in humans. *Am J Physiol.* 1997 Apr;272(4 Pt 1):E562-6.
- [12] Campfield LA, Smith FJ, Burn P. The OB protein (leptin) pathway--a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res.* 1996 Dec;28(12):619-32.
- [13] Kelesidis T, Mantzoros CS. The emerging role of leptin in humans. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2006 Mar;3(3):239-48.

- [14] Messinis IE, Milingos SD. Leptin in human reproduction. *Hum Reprod Update*. 1999 Jan-Feb;5(1):52-63
- [15] González RR, Simón C, Caballero-Campo P, Norman R, Chardonnens D, Devoto L *et al*. Leptin and reproduction. *Hum Reprod Update*. 2000 May-Jun;6(3):290-300.
- [16] Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod*. 1999 Feb;60(2):216-22.
- [17] Licinio J, Negrão AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB *et al*. Synchronicity of frequently sampled, 24-h concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone, and estradiol in healthy women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 3;95(5):2541-6.
- [18] Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatari T, Ohtani K, Sato N *et al*. Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol*. 1997 Aug;154(2):285-92.
- [19] Frisch RE. The right weight: body fat, menarche and ovulation. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1990 Sep;4(3):419-39.
- [20] Laughlin GA, Yen SS. Hypoleptinemia in women athletes: absence of a diurnal rhythm with amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Jan;82(1):318-21.
- [21] Welt CK, Chan JL, Bullen J, Murphy R, Smith P, DePaoli AM *et al*. Recombinant Human Leptin in Women with Hypothalamic Amenorrhea. *N Engl J Med*. 2004 Sep 2;351(10):987-97.
- [22] Chan JL, Matarese G, Shetty GK, Raciti P, Kelesidis I, Aufiero D *et al*. Differential regulation of metabolic, neuroendocrine, and immune function by leptin in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 May 30;103(22):8481-6.
- [23] Tartaglia AL. The Leptin Receptor. *J Biol Chem*. 1997 Mar 7;272(10):6093-6.
- [24] Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R *et al*. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995 Dec 29;83(7):1263-71.
- [25] Myers MG, Jr. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog Horm Res*. 2004;59:287-304.
- [26] Hegyi K, Fulop K, Kovacs K, Toth S, Falus A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int*. 2004;28(3):159-69.
- [27] Bjorbaek C, Buchholz RM, Davis SM, Bates SH, Pierroz DD, Gu H *et al*. Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *J Biol Chem*. 2001 Feb 16;276(7):4747-55.
- [28] Akerman F, Lei ZM, Rao CV. Human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor genes. *Gynecol Endocrinol*. 2002 Aug;16(4):299-306.

- [29] Buyse M, Berlioz F, Guilmeau S, Tsocas A, Voisin T, Peranzi G *et al.* PepT1-mediated epithelial transport of dipeptides and cephalixin is enhanced by luminal leptin in the small intestine. *J Clin Invest.* 2001 Nov;108(10):1483-94.
- [30] Ebenbichler CF, Kaser S, Laimer M, Wolf HJ, Patsch JR, Illsley NP. Polar expression and phosphorylation of human leptin receptor isoforms in paired, syncytial, microvillous and basal membranes from human term placenta. *Placenta.* 2002 Jul;23(6):516-21.
- [31] Frank S, Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J. Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *J Clin Invest.* 2000 Aug;106(4):501-9.
- [32] Goiot H, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Lardeux B, Lehy T *et al.* Antral mucosa expresses functional leptin receptors coupled to STAT-3 signaling, which is involved in the control of gastric secretions in the rat. *Gastroenterology.* 2001 Dec;121(6):1417-27.
- [33] Lee YJ, Park JH, Ju SK, You KH, Ko JS, Kim HM. Leptin receptor isoform expression in rat osteoblasts and their functional analysis. *FEBS Lett.* 2002 Sep 25;528(1-3):43-7.
- [34] Morton NM, Emilsson V, de Groot P, Pallett AL, Cawthorne MA. Leptin signalling in pancreatic islets and clonal insulin-secreting cells. *J Mol Endocrinol.* 1999 Apr;22(2):173-84.
- [35] Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H *et al.* Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Dec;82(12):4144-8.
- [36] Bluher S, Christos S. Leptin in reproduction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2007 Dec;14(6):458-64.
- [37] Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:305-31.
- [38] Hileman SM, Pierroz DD, Masuzaki H, Bjorbaek C, El-Haschimi K, Banks WA *et al.* Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology.* 2002 Mar;143(3):775-83.
- [39] Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI *et al.* Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature.* 1996 Feb 15;379(6566):632-5.
- [40] Lammert A, Kiess W, Bottner A, Glasow A, Kratzsch J. Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 May 18;283(4):982-8.
- [41] Li H, Matheny M, Tumer N, Scarpace PJ. Aging and fasting regulation of leptin and hypothalamic neuropeptide Y gene expression. *Am J Physiol.* 1998 Sep;275(3 Pt 1):E405-11.

- [42] Chan JL, Bluher S, Yiannakouris N, Suchard MA, Kratzsch J, Mantzoros CS. Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans. *Diabetes*. 2002 Jul;51(7):2105-12.
- [43] Heldin, H. C. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):213-23.
- [44] Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell*. 1994 Jan 28;76(2):253-62.
- [45] Fruhbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J*. 2006 Jan 1;393(Pt 1):7-20.
- [46] Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. *Larsen embriologia humana*. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- [47] Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. *Anatomia orientada para a clínica*. 6º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.
- [48] Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de histologia em cores*. 3º ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007
- [49] Ovário (Unifesp) [imagem de internet]. 2013. Disponível em: <http://www.unifesp.br/dmorfo/histologia/ensino/ovario/histologia.htm>.
- [50] Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica*. 12º ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.
- [51] Carneiro J, Junqueira LCU. *Histologia básica*. 11º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- [52] Abir R, Ao A, Jin S, Barnett M, Raanani H, Ben-Haroush A *et al*. Leptin and its receptors in human fetal and adult ovaries. *Fertil Steril*. 2005 Dec; 84(6): 1779-82.
- [53] Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittmer S, Snodgrass HR. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod*. 1997 Jun; 3(6): 467-72.
- [54] Kitawaki J, Kusuki I, Koshihara H, Tsukamoto K, Honjo H. Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. *Mol Hum Reprod*. 1999 Aug;5(8):708-13.
- [55] Messinis IE, Milingos SD, Alexandris E, Kariotis I, Kollios G, Seferiadis K. Leptin concentrations in normal women following bilateral ovariectomy. *Hum Reprod*. 1999 Apr;14(4):913-8.
- [56] Gao X, Yeh YC, Outley J, Simon J, Botteman M, Spalding J. Health-related quality of life burden of women with endometriosis: a literature review. *Curr Med Res Opin*. 2006 Sep;22(9):1787-97.

- [57] Gruppo italiano per lo studio dell'endometriosi. Prevalence and anatomical distribution of endometriosis in women with selected gynaecological conditions: results from a multicentric Italian study. *Hum Reprod.* 1994 Jun;9(6):1158-62.
- [58] Hwu YM, Wu FS, Li SH, Sun FJ, Lin MH, Lee RK. The impact of endometrioma and laparoscopic cystectomy on serum anti-Müllerian hormone levels. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011 Jun 9; 9: 80.
- [59] Chapron C, Pietin-Vialle C, Borghese B, Davy C, Foulot H, Chopin N. Associated ovarian endometrioma is a marker for greater severity of deeply infiltrating endometriosis. *Fertil Steril.* 2009 Aug; 92(2): 453-7.
- [60] Vercellini P, Fedele L, Aimi G, Pietropaolo G, Consonni D, Crosignani PG. Association between endometriosis stage, lesion type, patient characteristics and severity of pelvic pain symptoms: a multivariate analysis of over 1000 patients. *Hum Reprod.* 2007 Jan;22(1):266-71.
- [61] American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril.* 1997 May;67(5):817-21.
- [62] Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dofour P. Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001 May;96(1):21-34.
- [63] Ozkan S, Murk W, Arici A. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Apr;1127:92-100.
- [64] Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S, Borini A. Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2010 Aug; 27(8): 441-7.
- [65] Arruda MS, Petta CA, Abrão MS, Benetti-Pinto CL. Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women. *Hum Reprod.* 2003 Apr;18(4):756-9.
- [66] Cheng YM, Wang ST, Chou CY. Serum CA-125 in preoperative patients at high risk for endometriosis. *Obstet Gynecol.* 2002 Mar;99(3):375-80.
- [67] Moore J, Copley S, Morris J, Lindsell D, Golding S, Kennedy S. A systematic review of the accuracy of ultrasound in the diagnosis of endometriosis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002 Dec;20(6):630-4.
- [68] Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R *et al*; ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod.* 2005 Oct;20(10):2698-704. Epub 2005 Jun 24.
- [69] Hauth EA, Antoch G, Ruehm SG, Böing C, Kimmig R, Forsting M. Value of pelvic MRI in the preoperative diagnosis of endometriosis *Rofo.* 2004 Sep;176(9):1265-70.

- [70] Abbas AK, Kumar V, Fausto N, Aster JC. Robbins & Cotran Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 8º ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.
- [71] Lebovic DI, Mueller MD, Taylor, RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril*. 2001; 75:1.
- [72] Bernardi LA, Pavone ME. Endometriosis: an update on management. *Womens Health (Lond Engl)*. 2013 May;9(3):233-50. doi: 10.2217/whe.13.24.
- [73] Lee HJ, Lee JE, Ku SY, Kim SH, Kim JG, Moon SY *et al*. Natural conception rate following laparoscopic surgery in infertile women with endometriosis. *Clin Exp Reprod Med*. 2013 Mar;40(1):29-32.
- [74] Rana N, Thomas S, Rotman C, Dmowski WP. Decrease in the size of ovarian endometriomas during ovarian suppression in stage IV endometriosis. Role of preoperative medical treatment. *J Reprod Med*. 1996 Jun;41(6):384-92.
- [75] Chapron C, Vercellini P, Barakat H, Vieira M, Dubuisson JB. Management of ovarian endometriomas. *Hum Reprod Update*. 2002 Nov-Dec;8(6):591-7.
- [76] Carmona F, Martínez-Zamora MA, Rabanal A, Martínez-Román S, Balasch J. Ovarian cystectomy versus laser vaporization in the treatment of ovarian endometriomas: a randomized clinical trial with a five-year follow-up. *Fertil Steril*. 2011 Jul;96(1):251-4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.04.068. Epub 2011 May 14.
- [77] Podgaec S, Abrão MS. Endometriose. In: Fonseca AM, Bagnoli VR, Pinotti JA, editores. *Ginecologia endócrina*. São Paulo: Atheneu; 2004; 195-202.
- [78] Bricou A, Batt RE, Chapron C. Peritoneal fluid flow influences anatomical distribution of endometriotic lesions: why Sampson seems to be right. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008 Jun;138(2):127-34.
- [79] Laschke MW, Menger MD. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2007 Jul-Aug;13(4):331-42.
- [80] Healy DL, Rogers PA, Hii L, Wingfield M.. Angiogenesis: a new theory for endometriosis. *Hum Reprod Update*. 1998 Sep-Oct;4(5):736-40.
- [81] Eisermann J, Gast MJ, Pineda J, Odem RR, Collins JL. Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery. *Fertil Steril*. 1988 Oct;50(4):573-9
- [82] Khorram O, Taylor RN, Ryan IP, Schall TJ, Landers DV. Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1993 Dec;169(6):1545-9.
- [83] Keenan JA, Chen TT, Chadwell NL, Torry DS, Caudle MR. Interferon-gamma (IFN-gamma) and interleukin-6 (IL-6) in peritoneal fluid and macrophage conditioned media of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 1994 Oct;32(3):180-3.

- [84] Ryan IP, Tseng JF, Schriock ED, Khorram O, Landers DV, Taylor RN. Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1995 Apr;63(4):929-32.
- [85] Mahnke JL, Dawood MY, Huang JC. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2000 Jan;73(1):166-70.
- [86] Matarese G, Alviggi C, Sanna V, Howard JK. Increased leptin levels in serum and peritoneal fluid of patients with pelvic endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Jul;85(7):2483-7.
- [87] Alfer J, Muller-Schottle F, Classen-Linke I, von Rango U, Happel L. The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility. *Mol Hum Reprod*. 2000 Jul; 6(7): 595–601.
- [88] Viganò P, Somigliana E, Matrone R, Dubini A, Barron C, Vignali M *et al*. Serum Leptin Concentrations in Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Mar;87(3):1085-7.
- [89] Wu MH, Chuang PC, Chen HM, Lin CC, Tsai SJ. Increased leptin expression in endometriosis cells is associated with endometrial stromal cell proliferation and leptin gene up-regulation. *Mol Hum Reprod*. 2002 May;8(5):456-64.
- [90] Alviggi C, Clarizia R, Castaldo G, Matarese G, Colucci CC, Conforti S *et al*. Leptin concentrations in the peritoneal fluid of women with ovarian endometriosis are different according to the presence of a 'deep' or 'superficial' ovarian disease. *Gynecol Endocrinol*. 2009 Sep; 25(9): 610-5.
- [91] De Placido G, Alviggi C, Carravetta C, Pisaturo ML, Sanna V, Wilding M *et al*. The peritoneal fluid concentration of leptin is increased in women with peritoneal but not ovarian endometriosis. *Hum Reprod*. 2001 Jun;16(6):1251-4.
- [92] Maneschi F, Marasá L, Incandela S, Mazzaresse M, Zupi E. Ovarian cortex surrounding benign neoplasms: a histologic study. *Am J Obstet Gynecol*. 1993 Aug;169(2 Pt 1):388-93.
- [93] Hachisuga T, Kawarabayashi T. Histopathological analysis of laparoscopically treated ovarian endometriotic cysts with special reference to loss of follicles. *Hum Reprod*. 2002 Feb;17(2):432-5.
- [94] Alborzi S, Foroughinia L, Kumar PV, Asadi N, Alborzi S. A comparison of histopathologic findings of ovarian tissue inadvertently excised with endometrioma and other kinds of benign ovarian cyst in patients undergoing laparoscopy versus laparotomy. *Fertil Steril*. 2009 Dec;92(6):2004-7.
- [95] Muzii L, Bellati F, Bianchi A, Palaia I, Mancini N, Zullo MA *et al*. Laparoscopic stripping of endometriomas: a randomized trial on different surgical techniques. Part II: pathological results. *Hum Reprod*. 2005 Jul;20(7):1987-92.

- [96] Muzii L, Marana R, Angioli R, Bianchi A, Cucinella G, Vignali M *et al.* Histologic analysis of specimens from laparoscopic endometrioma excision performed by different surgeons: does the surgeon matter? *Fertil Steril.* 2011 May;95(6):2116-9.
- [97] Hughesdon PE. The structure of endometrial cysts of the ovary. *J Obstet Gynaecol Br Emp.* 1957 Aug;64(4):481-7.
- [98] Alborzi S, Zarei A, Alborzi S, Alborzi M. Management of ovarian endometrioma. *Clin Obstet Gynecol.* 2006 Sep;49(3):480-91.
- [99] Ercan CM, Sakinci M, Duru NK, Alanbay I, Karasahin KE, Baser I. Antimullerian hormone levels after laparoscopic endometrioma stripping surgery. *Gynecol Endocrinol.* 2010 Jun;26(6):468-72.
- [100] Teirmaa T, Luukkaa V, Rouru J, Koulu M, Huupponen R. Correlation between circulating leptin and luteinizing hormone during the menstrual cycle in normal-weight women. *Eur J Endocrinol.* 1998 Aug;139(2):190-4.
- [101] Shah DK, Correia KF, Vitonis AF, Missmer SA. Body size and endometriosis: results from 20 years of follow-up within the Nurses' Health Study II prospective cohort. *Hum Reprod.* 2013 May 14.
- [102] Choi YS, Oh HK, Choi JH. Expression of adiponectin, leptin, and their receptors in ovarian endometrioma. *Fertil Steril.* 2013 Apr 8. pii: S0015-0282(13)00420-2.
- [103] Nácúl AP, Lecke SB, Edelweiss MI, Morsch DM, Spritzer PM. Gene expression of leptin and long leptin receptor isoform in endometriosis: a case-control study. *Obstet Gynecol Int.* 2013;2013:879618.
- [104] Milewski Ł, Barcz E, Dziunycz P, Radomski D, Kamiński P, Roszkowski PI *et al.* Association of leptin with inflammatory cytokines and lymphocyte subpopulations in peritoneal fluid of patients with endometriosis. *J Reprod Immunol.* 2008 Oct;79(1):111-7.
- [105] Garonna E, Botham KM, Birdsey GM, Randi AM, Gonzalez-Perez RR, Wheeler-Jones CP. Vascular endothelial growth factor receptor-2 couples cyclo-oxygenase-2 with pro-angiogenic actions of leptin on human endothelial cells. *PLoS One.* 2011 Apr 18;6(4):e18823.
- [106] Styer AK, Sullivan BT, Puder M, Arsenault D, Petrozza JC, Serikawa T *et al.* Ablation of leptin signaling disrupts the establishment, development, and maintenance of endometriosis-like lesions in a murine model. *Endocrinology.* 2008 Feb;149(2):506-14.
- [107] Oh HK, Choi YS, Yang YI, Kim JH, Leung PC, Choi JH. Leptin receptor is induced in endometriosis and leptin stimulates the growth of endometriotic epithelial cells through the JAK2/STAT3 and ERK pathways. *Mol Hum Reprod.* 2013 Mar;19(3):160-8.
- [108] Otvos L Jr, Terrasi M, Cascio S, Cassone M, Abbadessa G, De Pascali F, Scolaro L, Knappe D, Stawikowski M, Cudic P, Wade JD, Hoffmann R, Surmacz E. Development

of a pharmacologically improved peptide agonist of the leptin receptor. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Oct;1783(10):1745-54.

- [109] Leavis PC, inventor. Novel retro-inverso leptin peptide antagonist. United States patente US 20120245104A1. 2012 Sep 27.
- [110] Gertler A. Development of leptin antagonists and their potential use in experimental biology and medicine. *Trends Endocrinol Metab*. 2006 Nov;17(9):372-8
- [111] Barcz E, Milewski L, Radomski D, Dziunycz P, Kamiński P, Roszkowski PI *et al*. A relationship between increased peritoneal leptin levels and infertility in endometriosis. *Gynecol Endocrinol*. 2008 Sep;24(9):526-30.
- [112] Bedaiwy MA, Falcone T, Goldberg JM, Sharma RK, Nelson DR, Agarwal A. Peritoneal fluid leptin is associated with chronic pelvic pain but not infertility in endometriosis patients. *Hum Reprod*. 2006 Mar;21(3):788-91.
- [113] Gungor T, Kanat-Pektas M, Karayalcin R, Mollamahmutoglu L. Peritoneal fluid and serum leptin concentrations in women with primary infertility. *Arch Gynecol Obstet*. 2009 Mar;279(3):361-4.
- [114] Jansen RP, Russell P. Nonpigmented endometriosis: clinical, laparoscopic, and pathologic definition. *Am J Obstet Gynecol*. 1986 Dec;155(6):1154-9.
- [115] Balasch J, Creus M, Fábregues F, Carmona F, Ordi J, Martínez-Román S *et al*. Visible and non-visible endometriosis at laparoscopy in fertile and infertile women and in patients with chronic pelvic pain: a prospective study. *Hum Reprod*. 1996 Feb;11(2):387-91.
- [116] Anifandis G, Koutselini E, Stefanidis I, Liakopoulos V, Leivaditis C, Mantzavinos T *et al*. Serum and follicular fluid leptin levels are correlated with human embryo quality. *Reproduction*. 2005 Dec;130(6):917-21.

APÊNDICE A – TCLE grupo controle**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa “EXPRESSÃO DA LEPTINA E SEUS RECEPTORES EM MULHERES COM OVÁRIOS NORMAIS OU COM ENDOMETRIOMAS”.

O objetivo desse trabalho é comparar o ovário doente (com endometriose) e o ovário sadio (normal), para descobrir se uma proteína chamada leptina, pode estar envolvida com a origem dessa doença e com a sua pior consequência, a infertilidade. Essa pesquisa se justifica pelo fato da endometriose ser uma doença que atinge muitas mulheres que querem engravidar, mas não conseguem e ainda sofrem com cólicas fortes e dor durante a relação sexual. Não se sabe ao certo como essa doença aparece e porque ela causa dificuldade para engravidar e, além disso, ainda não encontraram a cura.

Durante sua cirurgia para laqueadura das trompas ou retirada do útero, um pequeno fragmento do seu ovário também será retirado (biópsia). Isso não irá alterar a função do seu ovário e nem aumentará o risco da sua cirurgia. Uma parte será enviada para estudo no laboratório de anatomia patológica do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) e assim você receberá um laudo do laboratório para saber se o seu ovário está saudável ou não. Se ele estiver saudável a outra parte será enviada para o laboratório de Biologia Humana e experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro para que possa ser utilizado na pesquisa. Se for diagnosticado alguma doença você será acompanhado e tratado no HUPE pela mesma equipe médica. A amostra que for enviada para o estudo será identificada no laboratório por um código formado por números e/ou letras, preservando integralmente a privacidade e identidade do doador. Será também anotado seu peso, altura, idade, presença ou não de infertilidade, as medicações que você estiver usando e se você tem algum problema de saúde.

Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá prejudicar seu tratamento e você não perderá seu acompanhamento pela equipe médica. Sua identidade jamais será revelada em nenhum momento por nenhum dos pesquisadores e os resultados serão confidenciais. Seu nome ou material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

Este documento possui duas vias originais. Uma via deste consentimento informado será fornecida a você e outra será arquivada pela pesquisadora responsável, Dra. Carolina Zendron Machado Pinto, cujo telefone para qualquer contato, caso seja necessário é 2868-8269 ou 9729-4664 e o e-mail carolzendron@hotmail.com. O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUPE também é responsável pelo acompanhamento do estudo e você também poderá entrar em contato para solicitar informações e tirar suas dúvidas a qualquer momento. O CEP funciona no térreo do HUPE localizado na Boulevard 28 de setembro, 77 - Vila Isabel - Cep 20.551-030 - Rio de Janeiro – RJ. Atendimento de segunda-feira a sexta-feira das 09h00min-12h00minh e 13h00min-17h00min, e-mail hcep-hupe@uerj.br e telefone 2868-8253. Declaro que concordo em participar desse estudo, que recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e que me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 2012.

Assinatura do Paciente ou Responsável

Nome: _____

RG: _____ CPF: _____

Assinatura do pesquisador

Assinatura do orientador

APÊNDICE B – TCLE grupo endometrioma

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa “EXPRESSÃO DA LEPTINA E SEUS RECEPTORES EM MULHERES COM OVÁRIOS NORMAIS OU COM ENDOMETRIOMAS”.

O objetivo desse trabalho é comparar o ovário doente (com endometriose) e o ovário sadio (normal), para descobrir se uma proteína chamada leptina, pode estar envolvida com a origem dessa doença e com a sua pior consequência, a infertilidade. Essa pesquisa se justifica pelo fato da endometriose ser uma doença que atinge muitas mulheres que querem engravidar, mas não conseguem e ainda sofrem com cólicas fortes e dor durante a relação sexual. Não se sabe ao certo como essa doença aparece e porque ela causa dificuldade para engravidar e, além disso, ainda não encontraram a cura.

Durante sua cirurgia para endometriose parte da doença retirada do ovário (biópsias), será enviado para estudo no laboratório de anatomia patológica do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) e assim você receberá um laudo do laboratório para confirmar se o seu ovário está mesmo com endometriose. Se ele estiver realmente doente a outra parte será enviada para o laboratório de Biologia Humana e experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro para que possa ser utilizado na pesquisa. Se for diagnosticado alguma outra doença você será acompanhado e tratado no HUPE pela mesma equipe médica. A amostra que for enviada para o estudo será identificada no laboratório por um código formado por números e/ou letras, preservando integralmente a privacidade e identidade do doador. Será também anotado seu peso, altura, idade, presença ou não de infertilidade, as medicações que você estiver usando e se você tem algum problema de saúde.

Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá prejudicar seu tratamento e você não perderá seu acompanhamento pela equipe médica. Sua identidade jamais será revelada em nenhum momento por nenhum dos pesquisadores e os resultados serão confidenciais. Seu nome ou material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

Este documento possui duas vias originais. Uma via deste consentimento informado será fornecida a você e outra será arquivada pela pesquisadora responsável, Dra. Carolina Zendron Machado Pinto, cujo telefone para qualquer contato, caso seja necessário é 2868-8269 ou 9729-4664 e o e-mail carolzendron@hotmail.com. O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUPE também é responsável pelo acompanhamento do estudo e você também poderá entrar em contato para solicitar informações e tirar suas dúvidas a qualquer momento. O CEP funciona no térreo do HUPE localizado na Boulevard 28 de setembro, 77 - Vila Isabel - Cep 20.551-030 - Rio de Janeiro – RJ. Atendimento de segunda-feira a sexta-feira das 09h00min-12h00minh e 13h00min-17h00min, e-mail hcep-hupe@uerj.br e telefone 2868-8253. Declaro que concordo em participar desse estudo, que recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e que me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 2012.

Assinatura do Paciente ou Responsável

Nome: _____

RG: _____ CPF: _____

Assinatura do pesquisador

Assinatura do orientador

CEP/HUPE - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO
ERNESTO. TEL: (21) 2868-8253

APÊNDICE C – Increased expression of the leptin receptor in human ovaries affected by endometrioma and detection of high levels of leptin in the ovarian endometriomal fluid (Artigo científico)

Increased expression of the leptin receptor in human ovaries affected by endometrioma and detection of high levels of leptin in the ovarian endometriomal fluid

Carolina ZM Rudge ^{1*}, Helder F Gonçalves², Fernanda S Cavalcante², Tiago RD Pereira¹, Alessandra V Evangelista¹, Cristiane F Ramos², Marco Aurélio P Oliveira¹.

¹ Department of Gynecology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil, postal code 20551-030.

² Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Diseases, Department of Anatomy, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil, postal code 20551-030.

*Corresponding author: carolzendron@hotmail.com

Email: Carolina ZM Rudge carolzendron@hotmail.com - Helder F Gonçalves goncalves.hf@gmail.com - Fernanda S Cavalcante fevy_cavalcante@hotmail.com - Tiago RD Pereira thiago_dantas@terra.com.br - Alessandra V Evangelista alevhe@gmail.com - Cristiane F Ramos c Ramos_uerj@yahoo.com.br - Marco Aurélio P Oliveira endometriose@gmail.com

ABSTRACT

BACKGROUND: This study was designed to investigate leptin levels in the fluid in ovarian endometriomas (OEs) and to compare the expression of leptin and its receptors (OBR) in ovarian tissue affected by endometrioma in infertile women to its expression in the normal ovarian tissue of fertile controls without endometriosis. **METHODS:** In this case-control observational study, ovarian tissue, blood samples and peritoneal fluid were obtained from 20 women (10 fertile controls without endometriosis or any ovarian disease, who were undergoing tubal ligation surgery, and 10 infertile women with severe endometriosis and OE). The ovarian endometriomal fluid (EF) was aspirated, and peritoneal-implant (PI) biopsies were performed. The tissues removed during the surgeries were immediately frozen in liquid nitrogen to determine expression levels by western blot and leptin levels by ELISA. **RESULTS:** OBR was expressed at higher levels in the ovarian tissue affected by endometrioma than in the normal ovarian tissue (control=0.38±0.05, study=0.60±0.09, p=0.03), but there was no significant difference in leptin levels between these groups (control=0.57±0.1, study=0.35±0.1, p=0.18). Positive and significant correlations were observed between leptin and OBR in the OE (r=0.85, p= 0.004) and in the PI (r=0.87, p= 0.001). ELISA results demonstrate a greater leptin concentration within the EF compared with the serum and the PF (serum=8.4±1.0, PF=1.6±0.5, EF=73.8±16.2, p=0.0001), but there was no correlation between these variables. A positive, significant and strong correlation was observed between PF leptin levels and the expression of leptin and OBR in PI (leptin: r=0.88, p=0.0008; OBR: r=0.96, p=0.0001) and between the EF leptin levels and the expression of leptin and OBR in the OE (leptin: r=0.94, p=0.001; OBR: r=0.84, p=0.02). **CONCLUSIONS:** These data suggest that leptin may play an important role in the physiopathology of OE through a modulatory interaction with its active receptor.

Key words: leptin, leptin receptor, ovary, ovarian endometrioma, endometriomal fluid, endometriosis.

Background

Leptin, the product of the *ob/ob* gene [1] is an adipocyte-derived protein that regulates food intake and energy expenditure. Accumulating evidence shows that it is also a crucial factor in the endocrine regulation of several physiologic processes, including inflammation, angiogenesis and reproductive functions [2].

Endometriosis is a chronic and progressive disease associated with abnormal peritoneal and endometrial production of proinflammatory cytokines, growth factors and angiogenic factors [3], which may interfere with the function of the reproductive system.

Due to its inflammatory and angiogenic properties, as well as its possible involvement in reproductive abnormalities at both the central and the gonadal levels [4], leptin has been extensively studied in patients with endometriosis. A recent report demonstrated that leptin signaling is a necessary component of lesion proliferation, early vascular recruitment, and the maintenance of neoangiogenesis in a murine model of endometriosis [5]. Another report showed that the leptin receptor (OBR) is induced in endometriosis and that leptin stimulates the growth of endometriotic epithelial cells through the JAK2/STAT3 and ERK pathways [6].

Endometrioma is a localized form of endometriosis that primarily affects the ovaries and occurs in approximately 17-40% of women with endometriosis [7]. The pathogenesis of endometriotic ovarian cysts remains controversial, and their treatment remains a challenge. Ovarian endometriomas (OEs) form through progressive invagination of the ovarian cortex [8], suggesting that they are false cysts and that the cyst wall is made of the same material as the ovarian cortex [9]. OEs equal to or larger than 3 cm respond poorly to medical therapy [10], and both OEs and their surgical removal are associated with a significant reduction in the ovarian reserve, with negative effects on fertility [11].

The expression of leptin and its receptor has been described in OEs [12]. Small studies have demonstrated an increased concentration of this peptide in the peritoneal fluid (PF) of patients with endometriosis [13], and it is present at higher levels in women with peritoneal endometriosis than in women with ovarian endometriosis. Based on these findings, Alvigi suggests that patients with OE may show increased leptin levels in the ‘chocolate’ fluid in the endometrioma [14], but there is insufficient evidence to support this hypothesis.

As suggested by previous studies, leptin has a role in the pathogenesis of OE via inflammatory and angiogenic effects; however, no study had compared the expression of this protein in human ovarian tissue affected by endometrioma to its expression in normal ovarian tissue, and its presence in the chocolate fluid in OEs has never been investigated.

This study was designed to compare the expression of leptin and its receptors in ovarian tissue affected by endometrioma in infertile women to its expression in the normal ovarian tissue of fertile controls not affected by endometriosis. We also examine, for the first time, leptin levels in the ovarian endometriomal fluid (EF).

Methods

Patient enrollment

The study group consisted of ten patients who underwent laparotomy or laparoscopy for adnexal masses and infertility (n = 10). The inclusion criteria for this group were at least one year of primary infertility; regular cycles before starting hormonal treatment to control pain associated with endometriosis; unilateral or bilateral OE and normal male fertility. Peritoneal endometriotic lesions were observed in all patients in the study group. The control group was composed of ten women with proven fertility from the family-planning program of the same hospital who were undergoing mini-laparotomy or laparoscopy for tubal ligation and without surgical evidence of endometriosis or any ovarian pathology. All patients in the control group had a normal pelvic cavity. The surgeries were performed between February 8, 2013, and July 31, 2013, at the Department of Gynecology of the Pedro Ernesto University Hospital, Rio de Janeiro.

All of the subjects were of reproductive age and were receiving hormonal therapy for clinical treatment of pain associated with endometriosis or for contraception (in the control group). All enrolled patients had a body mass index (BMI) of 20-30 kg/m². The exclusion criteria were clinical and/or echographic indications of polycystic ovarian disease, diabetes and systemic hepatic or thyroid inflammatory disease and surgical evidence of any other ovarian pathology. The study was approved by the local ethics committee, and written informed consent was obtained from all patients before the procedures.

Tissue specimens

Serum samples were obtained before anesthesia. PF was aspirated from the posterior cul-de-sac at the beginning of surgery. A small wedge resection of the intact and healthy ovary was performed in the control group. The ovarian EF was aspirated, and the OE was

removed, always by the same surgeon by cystectomy. Peritoneal biopsies were performed in the study group to provide histological confirmation of endometriosis and data for the study.

The extent of endometriosis was scored according to the revised standards of the American Society of Reproductive Medicine [15]. A portion of each sample was sent to a pathologist, who reviewed the ovarian endometriomal specimens to confirm the presence of cyst wall-lining cells and ovarian-cortex cells, and normal ovary specimens were examined to confirm the absence of pathology. All samples used in the study were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Western blotting

Approximately 500 mg of tissue was homogenized in 500 μl of lysis buffer containing 1% NP-40 (Amresco, Ohio, USA) and a protease-inhibitor mix (Sigma), then centrifuged at 9700 rpm at 4°C . The protein concentration was measured by fluorometry (Qubit 2.0, Life Technologies Corporation, CA, USA), and 20- μg aliquots were applied to 8% SDS-polyacrylamide gel and submitted to vertical electrophoresis (150 mA, 50 V for 90 min), then transferred to nitrocellulose membranes (80 mA, 4 V for 90 min) in a semi-dry transfer apparatus. The membranes were subsequently incubated with antibodies (Santa Cruz, CA, USA) to leptin (1:500) and OBR (1:200). The expression of the proteins under study was normalized against the expression of β -actin. The bands were visualized by chemiluminescence (ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), and documented on the ChemiDoc MP System, Bio-Rad (Life Science Research, USA). All bands were quantified using Image J software 1.42q, USA.

Determining levels of leptin

The concentration (ng/ml) of leptin in serum, PF and EF was determined by ELISA (Millipore Corporation Billerica, MA, USA). The spectrophotometer was read according to the manufacturer's specifications.

Statistical analyses

We used GraphPad Prism (version 6.0, GraphPad Software, CA, USA) to test data for normality and homogeneity of variances. Student's t-test was used to compare the two groups, and analysis of variance was used to compare three groups. Pearson's correlation was performed to examine the correlations between some parameters. All results are reported as the mean \pm standard error of the mean (SEM), and P-values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

The age and BMI of the patients are expressed as the mean \pm the standard error (Table 1). All patients were classified as having stage-IV (severe) endometriosis, and in all patients in the study group, surgery was indicated by infertility associated with an adnexal mass. In the control group, all patients underwent surgery for tubal ligation. One inclusion criterion was the use of hormone therapy; 80% of patients in the study group and 60% of patients in the control group were using a combined oral contraceptive (estrogen and progesterone), and the remaining patients in both groups were using isolated progestin therapy.

Table 1. Baseline characteristics of participants

	Control	Study
<i>Demographic and anthropometric variables</i>		
N	10	10
Age (yr)	31.5 \pm 1.63	30.5 \pm 1.50
Body mass index (kg/m ²)	23.4 \pm 0.88	23.6 \pm 0.57
<i>Stage of disease</i>		
Stage IV (severe)	10 (100)	-
Stage III (moderate)	0 (0)	-
<i>Hormonal therapy</i>		
Estrogen + progesterone	6 (60)	8 (80)
Progesterone	4 (40)	2 (20)
<i>Indication for surgery</i>		
Infertility + adnexal mass	-	10 (100)
Tubal ligation	10 (100)	-

Values in parentheses are percentages

Age and BMI are expressed as the mean \pm

Western blots revealed no significant decrease in leptin levels in the study group (control=0.57±0.1, study=0.35±0.1, p=0.18), as shown in Figure 1 (A). In contrast, the receptor (Figure 1 B) was expressed at significantly higher levels in the same group (control=0.38±0.05, study=0.60±0.09, p=0.03). In the study group, there was no significant difference in the expression of leptin (PI=0.40 ± 0.09, OE=0.35 ± 0.11, p=0.71) and its receptors (PI=0.69 ± 0.16, OE=0.60 ± 0.09, p=0.61) between patients with ovarian OE and those with peritoneal implants (PI; Figure 2). A positive and significant correlation was observed between leptin and OBR expression in the OE (r=0.85, p= 0.004) and PI (r=0.87, p=0.001) of patients in the study group, but this relationship was not observed in the control group (r=0.41, p=0.22; Figure 3).

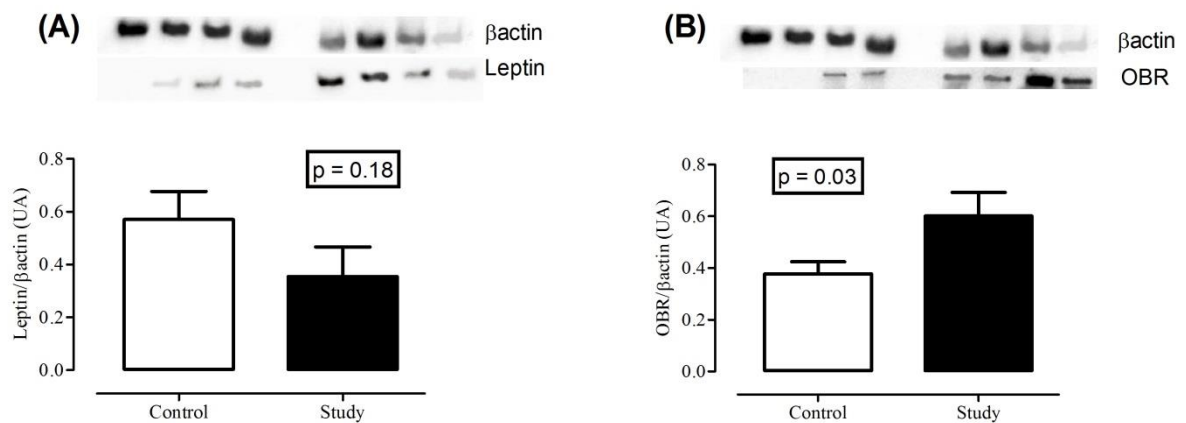


Figure 1. Expression of leptin (A) and the leptin receptor (OBR; B) in the control and study groups. Data are expressed as the mean +/- SEM per group of 10 subjects.

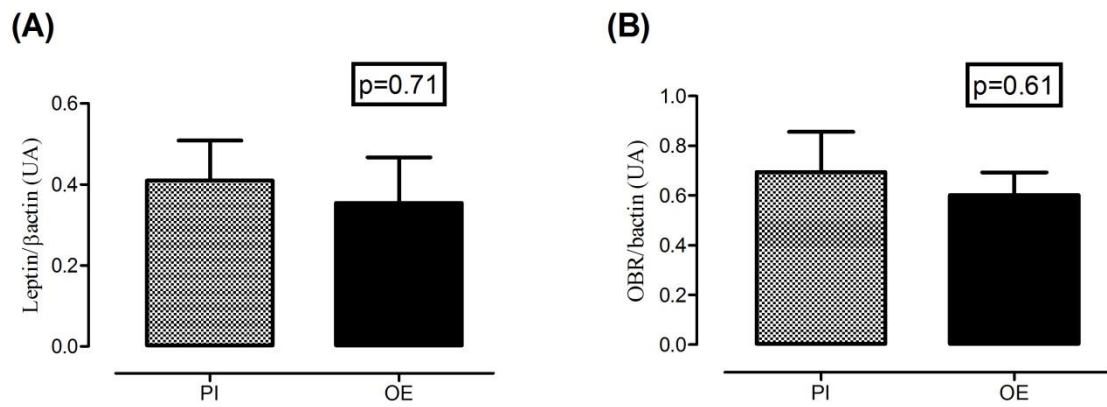


Figure 2. Expression of leptin (A) and the leptin receptor (OBR; B) in endometriotic peritoneal implants (PI) and in ovarian endometrioma (OE) in the study group. Data are expressed as the mean \pm SEM per group of 10 subjects.

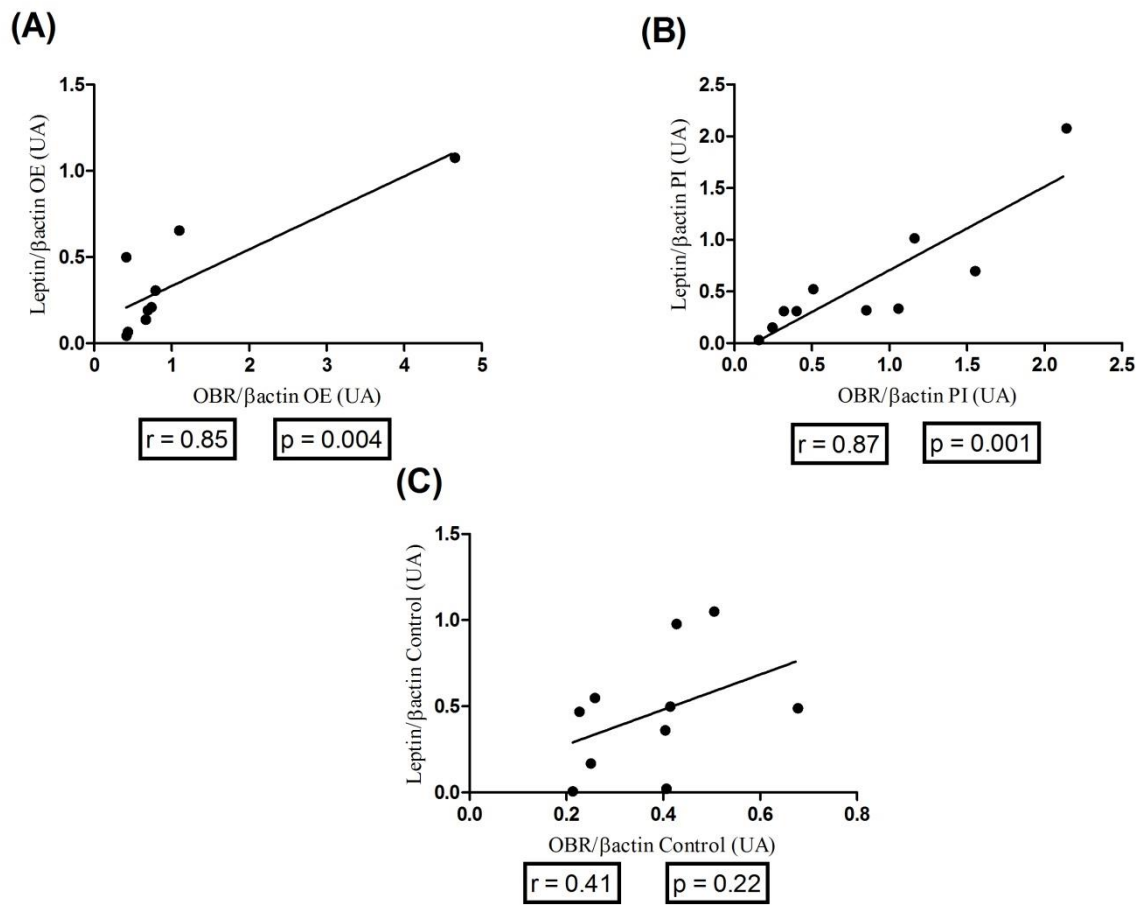


Figure 3. Correlation between leptin and leptin-receptor (OBR) levels in the study group, including patients with ovarian endometrioma (OE; A) and peritoneal implants (PI; B), and the control group (C).

There was no difference in serum leptin levels (Figure 4 A) in the control group compared to the study group (control= 8.6 ± 2.1 , study= 8.4 ± 1.01 , $p = 0.93$). In contrast, the leptin levels in the PF (Figure 4 B) were significantly higher in the study group (control= 0.15 ± 0.1 , study= 1.63 ± 0.5 , $p = 0.04$). The leptin levels in the serum, PF and EF of patients in the study group are presented in Figure 5. The leptin levels in the EF were significantly higher than those in the serum and PF (serum= 8.4 ± 1.0 , PF= 1.6 ± 0.5 , EF= 73.8 ± 16.2 , $p = 0.0001$).

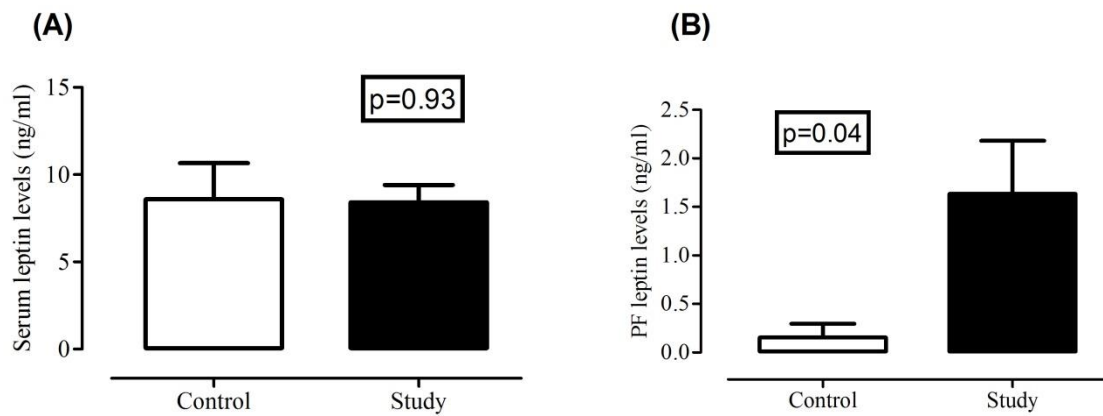


Figure 4. Leptin levels in serum (A) and the peritoneal fluid (PF; B) in the control and study groups. Data expressed as the mean \pm SEM per group of 10 subjects.

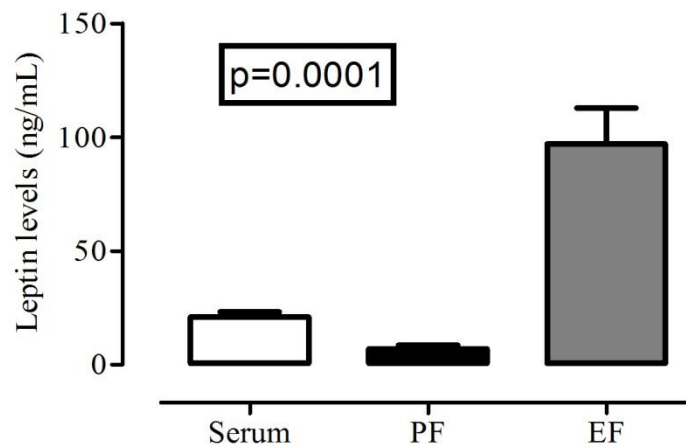


Figure 5. Leptin levels in the serum, peritoneal fluid (PF) and endometriomal fluid (EF) of patients in the study group. Data are expressed as the mean \pm SEM of 7 patients.

Figure 6 shows the correlations among leptin levels in the serum, PF and EF in the study group. Figure 6 A shows a non-significant, moderate positive correlation between leptin levels in serum and in PF ($r=0.57$, $p=0.08$). An inverse correlation was found between leptin levels in serum and EF (Figure 6 B), but this correlation was weak and non-significant ($r=-0.03$, $p=0.94$). The levels of leptin in the EF and PF (Figure 6 C) showed a positive and moderate ($r = 0.31$) but non-significant correlation ($p = 0.48$).

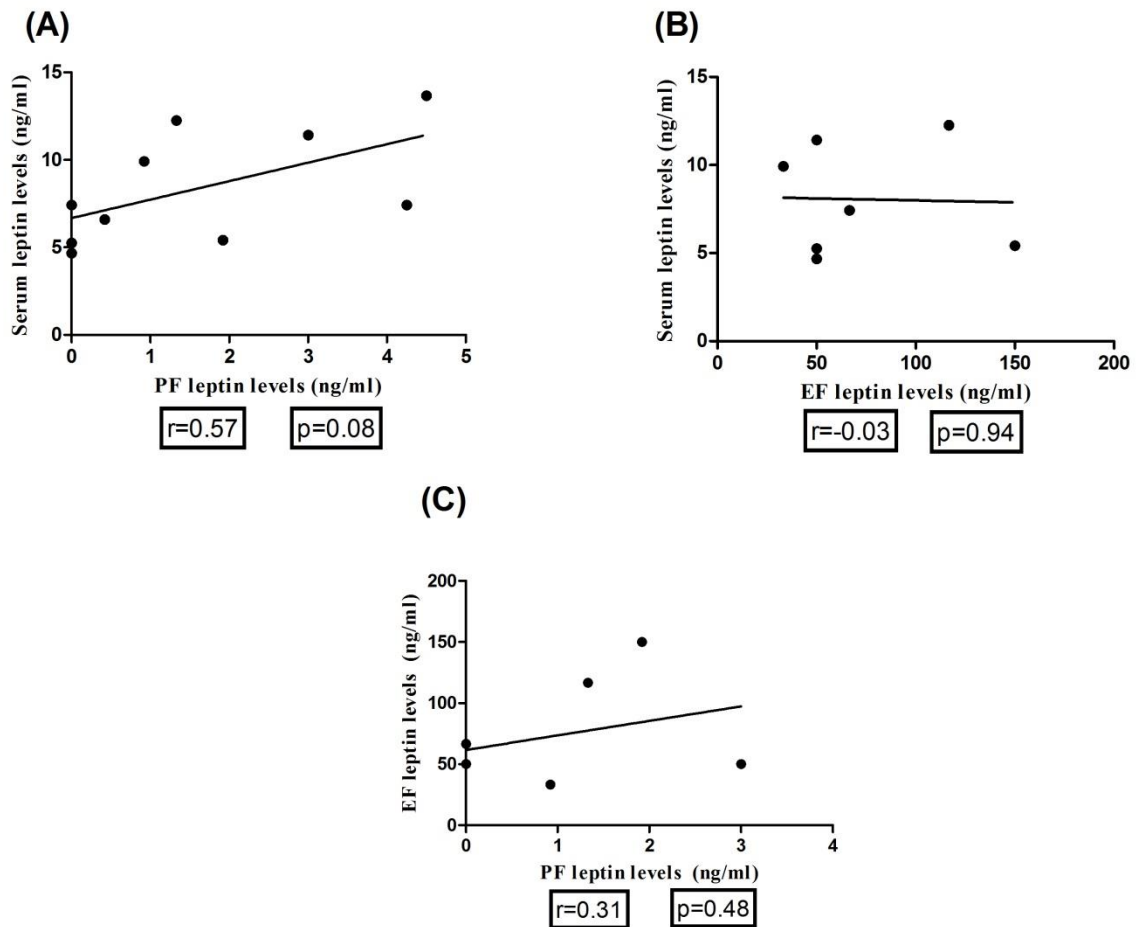


Figure 6. Correlation between leptin levels in (A) serum and peritoneal fluid (PF), (B) serum and endometriomal fluid (EF) and (C) endometriomal fluid (EF) and peritoneal fluid (PF) in the study group.

The correlation between leptin levels in the PF and the expression of leptin and OBR in the OE was positive but non-significant (leptin: $r=0.67$, $p=0.04$ /OBR: $r=0.67$, $p=0.02$; Fig 7 A), and this correlation was positive, significant and strong for PI (leptin: $r=0.88$, $p=0.0008$ /OBR: $r=0.96$, $p=0.001$), fig 7 (B). Leptin levels in the EF correlated strongly and positively with the expression of leptin and OBR in the OE (leptin: $r=0.94$, $p=0.001$ /OBR: $r=0.84$, $p=0.02$, Fig 8).

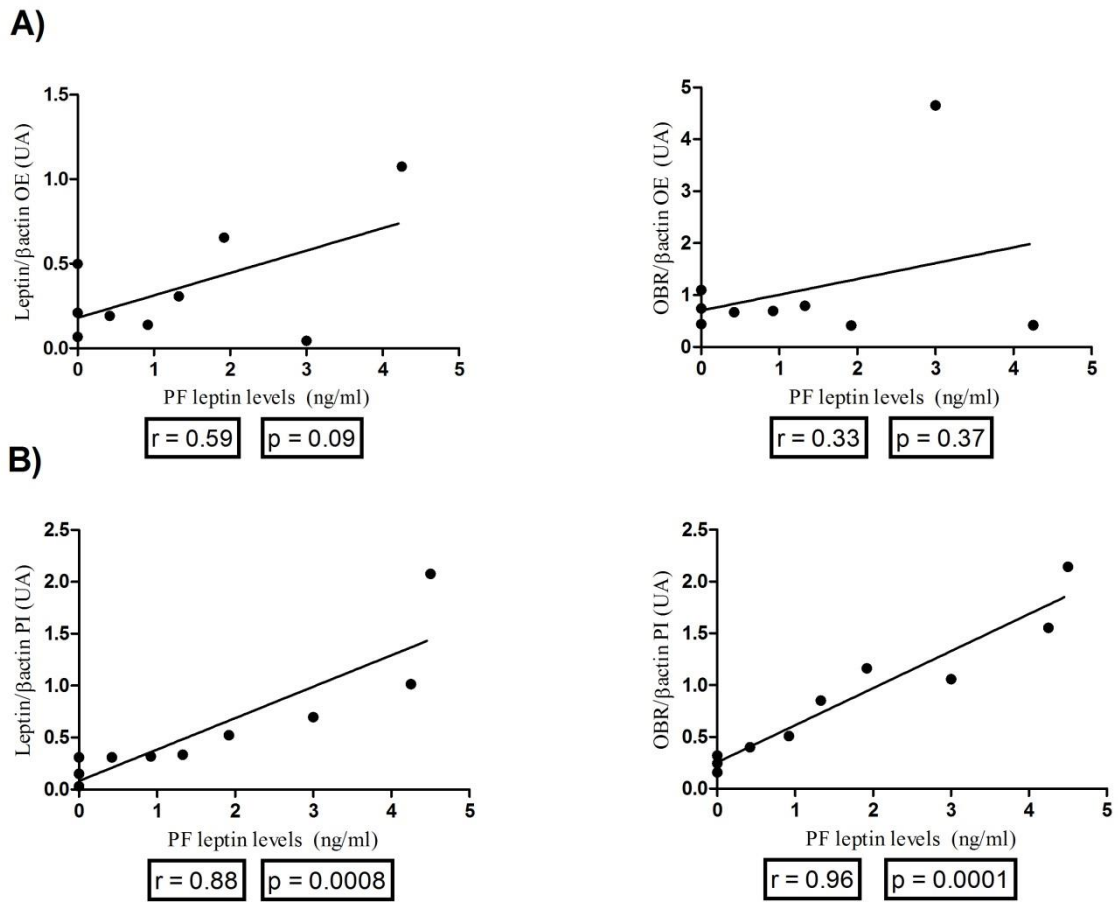


Figure 7. Correlations between leptin levels in the peritoneal fluid (PF) and the expression of leptin and OBR in the ovarian endometrioma (A) and peritoneal implants (B) in the study group.

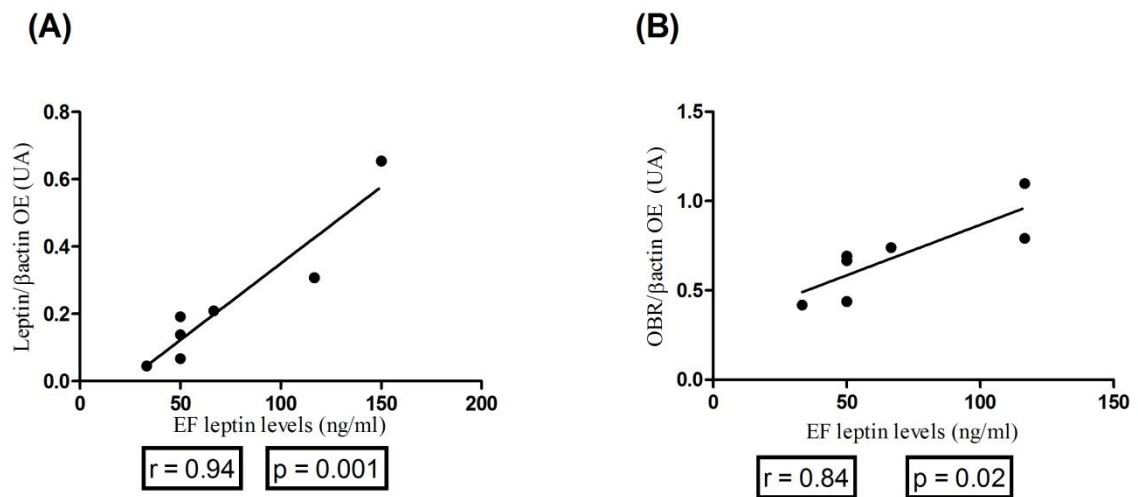


Figure 8. Correlations between leptin levels in the endometrial fluid (EF) and the expression of leptin (A) and the leptin receptor (OBR; B) in the study group.

Discussion

This observational case-control study showed that OBR is expressed at higher levels in ovarian tissue affected by endometrioma in infertile patients than in the normal ovarian tissue of fertile controls not affected by endometriosis. In contrast, leptin expression was slightly lower in the study group. These findings have never previously been described in the literature. Previous studies have used normal endometrium or PI in patients with endometriosis as control groups, whereas we used normal ovarian tissue. Wu et al. detected the leptin transcript and protein in both PI and OE and found no difference in the quantity of leptin transcript between these two groups [12]; however, the expression of leptin and OBR mRNA is increased in OEs compared with the normal endometrium. We also compared the expression of leptin and its receptors in the OE to its expression in PI in patients in our study group; as in the previous study, we found no difference between these two groups. Recently, the expression of leptin and OBR was found to be significantly higher in the OE than in normal endometrium [16]. Moreover, this same report showed that treatment of endometriotic cells with leptin induced the expression of OBR mRNA, which suggests autocrine and paracrine involvement of the leptin system in endometriosis. These data suggest that endometriosis implants are both a potential source of leptin production and a potential target of its action. Therefore, we suggest that ovarian tissue affected by endometrioma might be more responsive to leptin than normal ovarian tissue and might also have a greater capacity for synthesis of this peptide.

Although these groups are small, their relative homogeneity is a strength of this study. All women in the study group had infertility and stage-IV (severe) endometriosis. The stage of endometriosis is not correlated with the presence or severity of symptoms, but infertility is very likely in patients with stage IV endometriosis [15]. All women in the control group were fertile and underwent surgery for tubal ligation. Most studies include different stages of

endometriosis and other pelvic diseases, such as uterine leiomyoma or cancer in the controls, introducing potential bias. All women in this study were receiving hormone therapy, which provided a stable hormonal environment and eliminated the possibility of fluctuations in leptin levels during the menstrual cycle.

Our findings demonstrated an increase in PF leptin levels in infertile women with severe endometriosis and OE compared to fertile controls not affected by endometriosis and similar serum leptin levels in both groups. Serum leptin levels appear to be similar in women with and without endometriosis at any stage [17]. Furthermore, small studies have shown that PF leptin is significantly higher in endometriosis patients compared to those without the disease [18]. PF leptin levels were significantly higher in infertile women with endometriosis than in patients with pelvic pain and endometriosis [19] or unexplained infertility [20]. A study comparing women with primary infertility of different etiologies (endometriosis, PCOS, ESCA and bilateral tubal obstruction) found that PF leptin levels were higher in the endometriosis group than in the other three groups [21].

PF leptin levels in patients with OE are elevated due to peritoneal endometriotic lesions or OE; the cause is presently unknown. One report showed that patients with “superficial” endometriomas had significantly higher levels of leptin in the PF than did patients with “deep” OEs [14]. Another report found that patients with PI at all stages of endometriosis showed higher PF leptin concentrations than patients with no implant, and the presence of OE had no significant main effect on leptin concentration [18]; however, isolated ovarian endometriosis is rare, as it is considered a marker for severe, deeply infiltrating endometriosis [22]. Furthermore, many endometriotic lesions, especially diaphragmatic and bowel lesions or atypical, non-pigmented PI, may not be visualized during surgery [23-24]. It is thus extremely difficult to exclude this variable.

Thus, peritoneal disease, but not ovarian endometriotic cysts, influences the concentration of leptin in PF in endometriosis; these two types of endometrial lesions may have different pathogenic mechanisms and distinct leptin-biosynthetic capacities [18]. Alternatively, the leptin may be sequestered into the cystic fluid of the OE [12]. We found increased levels of leptin in the EF compared to the PF of patients with both PI and OE; these variables were not correlated with each other. The increased levels of leptin in the EF may be the result of the slight decrease in leptin expression in ovarian tissue affected by endometrioma; this protein may have been secreted into the endometrioma and diffused in the chocolate fluid. In accordance with previous data, we believe that the concentration of leptin in the PF is influenced by PI; we also suggest that OEs influence leptin concentration in the EF.

Our findings show a strong positive correlation between the expression of leptin and OBR in OE and PI. A significant positive correlation was observed between leptin and OBR transcripts in ectopic endometria [25]. Although the difference was not statistically significant, previous data showed a modest positive correlation between the expression of leptin and that of OBR in patients with OEs [16]. Furthermore, these same authors demonstrated that leptin treatment induced OBR expression in endometriotic cells. We also demonstrated a significant positive correlation between PF leptin levels and the expression of leptin and OBR in PI, but this correlation was not observed in OE. In contrast, the expression of leptin and its receptor in OE correlated strongly and positively with leptin levels in EF. In contrast to our results, a significant negative correlation was observed between OBR transcripts and PF leptin levels in ectopic endometrium [25]. These significant positive correlations suggest that OBR may be induced in OE and PI by leptin levels in EF and PF, respectively.

Given the presence of large quantities of leptin in the OE, it remains unknown whether this inflammatory factor contributes to both the decreased oocyte reserve and the quality of the affected ovary. A prospective study revealed that elevated intra-ovarian leptin concentrations were associated with reduced ovarian stimulation and response, reduced follicle maturation, poorer embryo quality and a lower likelihood of successful pregnancy, suggesting that leptin modulates embryo quality and may serve as a sensitive marker of IVF outcomes [26]. We thus suggest that the increased leptin levels in the ovarian EF may play an important role in the reproductive abnormalities that accompany this disease, but further studies are required to support this hypothesis.

Disorders related to leptin deficit and leptin overabundance required the development of drugs that activate or inhibit the OBR [27]. The administration of the pegylated leptin peptide receptor antagonist (LPrA) or nonfunctional OBR (LeprdB) in a rat model of endometriosis demonstrated that disruption of leptin signaling can inhibit the establishment and development of endometriosis-like lesions that resemble peritoneal endometriotic foci [5]. A leptin mutant with antagonistic properties and other proteins that block leptin activity open up new possibilities for research and, eventually, therapy [28] for OE and similar diseases, which do not respond well to any available medication.

Conclusion

In summary, this study shows that the expression of OBR is higher in the ovarian tissue affected by OE in infertile patients than in the normal ovarian tissue of fertile controls not affected by endometriosis. We also demonstrated for the first time the presence of high levels of leptin in the chocolate fluid in the OE. These data suggest that leptin may have an important role in the physiopathology of OE through a modulatory interaction with its active receptor.

List of Abbreviations

Body mass index (BMI); endometrioma fluid (EF); leptin receptor (OBR); OE: ovarian endometrioma; peritoneal fluid (PF); peritoneal implants (PI);

Competing interests

The authors declare they have no competing interests.

Authors' contributions

CR contributed to conception and design, acquisition, analysis and interpretation of data and drafting the article. HG and FC carried out the experiments described in the manuscripts. TP and AE performed clinical data collection. CR and MAO contributed to conception, analysis and interpretation of data and reviewed the article critically for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank the staff and students who assisted with this study at the Pedro Ernesto University Hospital and at the Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Diseases of the Rio de Janeiro State University. The authors also thank Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ) for their financial support.

References

- 1-Gong DW, Bi S, Pratley RE, Weintraub BD. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem.* 1996;271:3971–3974.
- 2-Kelesidis T, Mantzoros CS. The emerging role of leptin in humans. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2006;3:239-48.
- 3-Lebovic DI, Mueller MD, Taylor, RN. Immunobiology of endometriosis. *Fétil Steril.* 2001;75:1.
- 4-Chan JL, Matarese G, Shetty GK, Raciti P, Kelesidis I, Aufiero D, De Rosa V, Perna F, Fontana S, Mantzoros CS. Differential regulation of metabolic, neuroendocrine, and immune function by leptin in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:8481–8486.
- 5-Styer AK, Sullivan BT, Puder M, Arsenault D, Petrozza JC, Serikawa T, Chang S, Hasan T, Gonzalez RR, Rueda BR. Ablation of leptin signaling disrupts the establishment, development, and maintenance of endometriosis-like lesions in a murine model. *Endocrinology.* 2008;149:506-14.
- 6-Oh HK, Choi YS, Yang YI, Kim JH, Leung PC, Choi JH. Leptin receptor is induced in endometriosis and leptin stimulates the growth of endometriotic epithelial cells through the JAK2/STAT3 and ERK pathways. *Mol Hum Reprod.* 2013;19:160-8.
- 7-Gruppo italiano per lo studio dell'endometriosi. Prevalence and anatomical distribution of endometriosis in women with selected gynaecological conditions: results from a multicentric Italian study. *Hum Reprod.* 1994;9:1158-62.
- 8-Hughesdon PE. The structure of endometrial cysts of the ovary. *J Obstet Gynaecol Br Emp.* 1957;64:481-7.

- 9-Alborzi S, Zarei A, Alborzi S, Alborzi M. Management of ovarian endometrioma. *Clin Obstet Gynecol.* 2006;49:480-91.
- 10-Donnez J, Smets M, Jadoul P, et al. Laparoscopic management of peritoneal endometriosis, endometriotic cyst and rectovaginal adenomyosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;997:274–281.
- 11-Hwu YM, Wu FS, Li SH, Sun FJ, Lin MH, Lee RK The impact of endometrioma and laparoscopic cystectomy on serum anti-Müllerian hormone levels. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9:80.
- 12-Wu MH, Chuang PC, Chen HM, Lin CC, Tsai SJ. Increased leptin expression in endometriosis cells is associated with endometrial stromal cell proliferation and leptin gene up-regulation. *Mol Hum Reprod.* 2002;8:456-64.
- 13-Matarese G, Alviggi C, Sanna V, Howard JK, Lord GM, Carravetta C, Fontana S, Lechler RI, Bloom SR, De Placido G. Increased leptin levels in serum and peritoneal fluid of patients with pelvic endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:2483-7
- 14-Alviggi C, Clarizia R, Castaldo G, Matarese G, Colucci CC, Conforti S, Pagano T, Revelli A, De Placido G. Leptin concentrations in the peritoneal fluid of women with ovarian endometriosis are different according to the presence of a 'deep' or 'superficial' ovarian disease. *Gynecol Endocrinol.* 2009;25:610-5.
- 15-American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis. *Fertil Steril.* 1996;67:817–821.
- 16-Choi YS, Oh HK, Choi JH. Expression of adiponectin, leptin, and their receptors in ovarian endometrioma. *Fertil Steril.* 2013.pii:S0015-0282(13)00420-2.

- 17-Viganò P, Somigliana E, Matrone R, Dubini A, Barron C, Vignali M, di Blasio AM Serum Leptin Concentrations in Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:1085-7
- 18-De Placido, G., Alviggi, C., Carravetta, C., Pisaturo, M.L., Sanna, V., Wilding, M., Lord, G.M. and Matarese, G. The peritoneal fluid concentration of leptin is increased in women with peritoneal but not ovarian endometriosis. *Hum Reprod.* 2001;16:1251-1254.
- 19-Barcz E, Milewski L, Radomski D, Dziunycz P, Kamiński P, Roszkowski PI, Malejczyk J. A relationship between increased peritoneal leptin levels and infertility in endometriosis. *Gynecol Endocrinol.* 2008;24:526-30.
- 20-Bedaiwy MA, Falcone T, Goldberg JM, Sharma RK, Nelson DR, Agarwal A. Peritoneal fluid leptin is associated with chronic pelvic pain but not infertility in endometriosis patients. *Hum Reprod.* 2006;21:788-91.
- 21-Gungor T, Kanat-Pektas M, Karayalcin R, Mollamahmutoglu L. Peritoneal fluid and serum leptin concentrations in women with primary infertility. *Arch Gynecol Obstet.* 2009;279:361-4.
- 22-Chapron C, Pietin-Vialle C, Borghese B, Davy C, Foulot H, Chopin N. Associated ovarian endometrioma is a marker for greater severity of deeply infiltrating endometriosis. *Fertil Steril.* 2009;92: 453-7.
- 23-Jansen RP, Russell P. Nonpigmented endometriosis: clinical, laparoscopic, and pathologic definition. *Am J Obstet Gynecol.* 1986;155:1154-9.
- 24-Balasz J, Creus M, Fábregues F, Carmona F, Ordi J, Martínez-Román S, Vanrell JA. Visible and non-visible endometriosis at laparoscopy in fertile and infertile women and in patients with chronic pelvic pain: a prospective study. *Hum Reprod.* 1996;11:387-91.

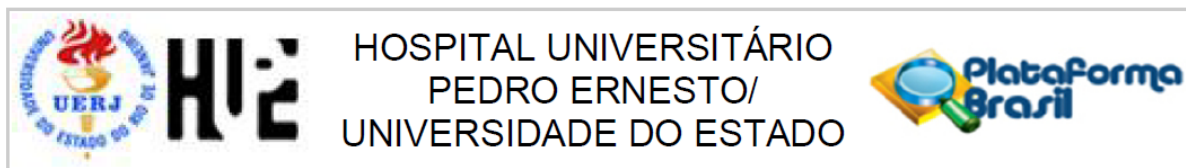
25-Nácul AP, Lecke SB, Edelweiss MI, Morsch DM, Spritzer PM. Gene expression of leptin and long leptin receptor isoform in endometriosis: a case-control study. *Obstet Gynecol Int.* 2013;2013:879618.

26-Anifandis G, Koutselini E, Stefanidis I, Liakopoulos V, Leivaditis C, Mantzavinos T et al. Serum and follicular fluid leptin levels are correlated with human embryo quality. *Reproduction.* 2005;130:917-21.

27-Otvos L Jr, Terrasi M, Cascio S, Cassone M, Abbadessa G, De Pascali F, Scolaro L, Knappe D, Stawikowski M, Cudic P, Wade JD, Hoffmann R, Surmacz E. Development of a pharmacologically improved peptide agonist of the leptin receptor. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783(10):1745-54.

28-Gertler A. Development of leptin antagonists and their potential use in experimental biology and medicine. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17(9):372-8.

ANEXO – Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão da leptina e seus receptores no ovário humano normal e no acometido por endometrioma

Pesquisador: CAROLINA ZENDRON MACHADO PINTO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 11404312.4.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 195.160

Data da Relatoria: 12/12/2012

Apresentação do Projeto:

Estruturado com seus itens obrigatórios descritos e claros

Objetivo da Pesquisa:

Bem definido e claro

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Pode haver benefício na identificação de um possível mecanismo fisiopatológico da endometriose. Preocupa o fato das pacientes do grupo controle serem submetidas a Bx de ovário. Mas está bem descrito que somente serão biopsiadas aquelas que serão submetidas a laqueadura. Não havendo Bx de ovário exclusivamente para esse fim

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nenhum

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados. O TCLE está bem completo explica bem e linguagem leiga sobre a Bx de ovário e as condutas em relação aos achados histopatológicos.

Recomendações:

Nenhuma

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

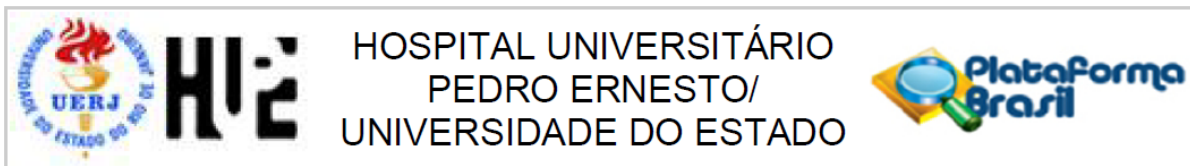
UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

Fax: (21)2264-0853

E-mail: cep-hupe@uerj.br

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Nenhuma

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
3. O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

RIO DE JANEIRO, 07 de Fevereiro de 2013

Assinador por:
WILLE OIGMAN
(Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

Fax: (21)2264-0853

E-mail: cep-hupe@uerj.br