Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Helder Ferreira Gonçalves

Avaliação do papel da leptina em diferentes focos ectópicos de pacientes com endometriose peritoneal severa

Rio de Janeiro
2014

Helder Ferreira Gonçalves

Avaliação do papel da leptina em diferentes focos ectópicos de pacientes com endometriose peritoneal severa

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Cristiane da Fonte Ramos

Rio de Janeiro

2014

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

G635 Gonçalves, Helder Ferreira.
Avaliação do papel da leptina em diferentes focos ectópicos de pacientes com endometriose peritoneal severa / Helder Ferreira Gonçalves – 2014.
55 f.

Orientadora: Cristiane da Fonte Ramos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Leptina - Teses. 2. Receptor para leptina – Teses. 3. Aromatase. 4. Líquido cístico. 5. Endometriose. I. Ramos, Cristiane da Fonte Ramos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 618.14-002

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

_____ _____

Assinatura Data

Helder Ferreira Gonçalves

Avaliação do papel da leptina em diferentes focos ectópicos de pacientes com endometriose peritoneal severa

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 17 de fevereiro de 2014.

Orientadora: Prof.ª Dra. Cristiane da Fonte Ramos

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.ª Dra. Cristiane da Fonte Ramos (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Vanessa de Souza Mello

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Flávia de Bittencourt Brasil

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

À minha avó, Marialva Borges Gonçalves, por todo apoio, carinho e amor, durante todos esses anos longe de casa.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo consentimento da bolsa de estudos.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, pelo financiamento do projeto que resultou este trabalho.

Aos secretários e aos professores da pós-graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Ao coordenador da pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, pela aceitação no programa e pelo grande apoio concedido a mim, para o desenvolvimento das técnicas laboratoriais deste estudo, no "Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular" – LMMC.

À Professora Dra. Cristiane da Fonte Ramos, orientadora, pela oportunidade única que me fez fixar na cidade do Rio de Janeiro. Pela confiança depositada em meu trabalho, sua dedicação, apoio e ensinamentos.

Às Professoras Doutoras, Flávia de Bittencourt Brasil e Vanessa de Souza Mello, pela aceitação para compor a banca examinadora deste trabalho.

À Dra. Carolina Zendron Machado Rudge, médica do ambulatório de ginecologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto e amiga, pelo imenso apoio durante o período de coleta, ensinamentos clínicos e desenvolvimento em conjunto deste trabalho.

À todas as pacientes do estudo advindas do ambulatório de ginecologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto, pelo aceitação e consentimento das amostras biológicas para o estudo.

À Sra.Cristiane de Souza Mendes, por realizar as dosagens do hormônio estradiol em todas as amostras sorológicas, no Laboratório de Hormônio – LABHOR/HUPE.Aos amigos de laboratório Flávia Gombar, Flávia Fernandes, Alini Scultz, Thatiany Marinho, Francielle Graus, Sandra Barbosa, Isabele Bringhenti e D'Angelo Magliano, pelos ensinamentos, convivência, trocas de ideias, e apoio durante todo o período de desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Bárbara do Nascimento Borges, amiga, mentora na pesquisa, a pessoa que me ensinou os primeiros passos na ciência. Meu eterno obrigado.

A minha mãe, Osmarina da Silva Ferreira, meus irmãos, Ulysses Gonçalves e Talita Gonçalves e minha avó Sônia Iolanda Gonçalves, pelo imenso apoio durante todos esses anos. Por sempre acreditarem em mim e por terem paciência de me esperar apenas duas ou três vezes por ano em casa, na minha cidade natal.

E por fim, e sim, mais importante, a minha avó Marialva Gonçalves, minha fiel companheira, minha base, meu espelho de vida, maior apoio, por ela nunca medir esforços para hoje eu ter chegado aqui. Por ter me mostrado o caminho certo a seguir na vida, durante todo o tempo de minha criação até os dias de hoje, e ainda por todo o apoio financeiro mesmo nos momentos de grandes dificuldades. À ela eu dedico esse trabalho.

Não sou nada.
Nunca serei nada.
Não posso querer ser nada.
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.

Fernando Pessoa

RESUMO

GONÇALVES, Helder Ferreira. *Avaliação do papel da leptina em diferentes focos ectópicos de pacientes com endometriose peritoneal severa*. 2014. 55f. Dissertação de Mestrado em Biologia Humana e Experimental – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Endometriose é uma doença de inflamação crônica e progressiva, caracterizada pela implantação e crescimento de estroma e/ou epitélio glandular endometrial, em focos ectópicos extrauterinos. A leptina é um hormônio adipócito-derivado, produzido predominantemente pelo tecido adiposo branco e além do seu papel na regulação do gasto energético influencia os processos reprodutivos. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de leptina no soro, no fluido peritoneal e no liquido cístico do endometrioma, além dos níveis de expressão proteica de leptina, seus receptores (ObR) e da enzima aromatase em três focos peritoneais em quinze pacientes com endometriose peritoneal, comparando com dez pacientes submetidas a cirurgia de ligadura de trompas. O grupo endometrioma apresentou níveis séricos de leptina elevados em comparação ao controle (controle=14,7ng/mL±2,6, endometriose=19,2ng/mL±1,8, $p<0,0001$) já no fluido peritoneal não houve diferença (controle=6,7ng/mL±1,2, endometriose=7,7 ng/mL±1,8, $p=0,2$). Comparando as mulheres com e sem implante no ovário, o nível de leptina no soro e no fluido peritoneal foi significativamente mais elevado em mulheres sem implante no ovário. Os níveis de leptina no líquido cístico foram maiores do que no soro e no fluido peritoneal (soro=14,87ng/mL±2,6, fluido peritoneal=7,77ng/mL±1,8, líquido cístico=97,07ng/mL±15,9, $p<0,0001$). A expressão proteica de leptina, ObR e aromatase mostrou-se aumentada nos tecidos implantados nos septos vaginas e diminuida nos tecidos implantados nos intestino. Os tecidos presentes nos ligamentos uterossacros apresentaram um nível de expressão médio. Podemos concluir que a presença da doença peritoneal e não o endometrioma é o fator que influencia a concentração da leptina presente no soro e no fluido peritoneal em pacientes com endometriose. Em adição, as diferenças nos níveis de expressão de leptina, ObR e aromatase entre os diferentes locais de implantação do tecido endometrial ectópico sugerem a possibilidade de estas proteínas estarem envolvidas na localização de implantação do endométrio ectópico.

Palavras-chave: Leptina. Receptor para leptina. Aromatase. Líquido cístico. Endometriose.

ABSTRACT

GONÇALVES, Helder Ferreira. *Leptin, its receptor and aromatase expression in deep infiltrating endometriosis* 2014. 55 f. Dissertação de Mestrado em Biologia Humana e Experimental – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

The aim of this study was to evaluate the leptin levels in the serum and peritoneal fluid (PF) and the protein expression in three different peritoneal ectopic implants in patients who underwent surgery for deep infiltrating endometriosis. The study group consisted of fifteen patients who underwent surgery for adnexal masses and infertility, while the control group consisted of ten women who underwent surgery for tubal ligation. The leptin levels in the serum and PF were evaluated by ELISA. The protein expression of leptin and its receptors (ObR) and aromatase enzyme were evaluated by Western blot analysis of the intestine, uterosacral ligament and vaginal septum in the ectopic implants. The t-test and one-way ANOVA with Holm-Sìdak post-test were used, and $p<0.05$ was considered to be statistically significant. Compared to the controls, the serum leptin levels (control= 14.7 ng/mL±2.63, endometriosis= 19.2 ng/mL±1.84, $p<0.0001$) were increased, while in PF, there was no difference (control= 6.68 ng/mL±0.43, endometriosis= 7.71 ng/mL±0.59, p= 0.18). Comparing women with and without ovarian implants, the leptin levels in both the serum and PF were significantly higher in women without ovarian implants (serum: with ovarian implant= 15.85±1.99; without ovarian implant= 23.14±2.60; ng/mL, p= 0.04; PF: with ovarian implant= 4.28±1.30; without ovarian implant= 11.18±2.98; ng/mL, p= 0.048). The leptin, ObR and aromatase protein expression levels were increased in lesions in the vaginal septum and were decreased in the intestine lesions. This study reports several interesting associations between the leptin levels in serum, PF, and tissue samples and the localization of the ectopic endometrium. Although this study does not provide a clear picture of the role of leptin in the development and progression of peritoneal implants, it contributed new data that might be useful to elucidating the enigma that is the role of leptin in endometriosis disease.

Keywords: Endometrial implants. Endometriosis. Leptin. Leptin receptor. Aromatase enzyme.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Possíveis locais de afecção por endometriose pélvica..... 13

Figura 2 – Imagens realizadas por vídeo-laparoscopia a região pélvica em seu estado anormal (a) e uma área do peritônio com múltiplas lesões endometrióticas..... 14

Figura 3 – Foto realizada em videolaparoscopia mostrando a apresentação macroscópica do endometrioma ovariano..... 15

Figura 4 – Ação central da leptina no balanço energético..... 18

Figura 5 – Representação esquemática da natureza pleiotrópica de leptina..... 19

Figura 6 – Diagrama esquemático ilustrando a interação da leptina com o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e o endométrio..... 21

Figura 7 – As seis isoformas do receptor da leptina obtidos por *splicing* alternativo, designados ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe e ObRf..... 22

Figura 8 – Representação esquemática de internalização lisossomal e degradação do receptor longo (ObRb) e curto (Ob-Ra) de leptina, via vesículas clatrino-revestidas..... 23

Figura 9 – Níveis de leptina no soro e no fluido peritoneal dos grupos controle e endometriose..... 32

Figura 10 – Níveis de leptina no soro, no fluido peritoneal e no líquido cístico do endometrioma no grupo endometrioma..... 33

Figura 11 – Níveis de estradiol sérico no grupo controle e endometriose..... 34

Figura 12 – Níveis de expressão proteica da enzima aromatase nos três locais de acometimento do grupo endometriose..... 35

Figura 13 – Correlação de Pearson entre os níveis de estradiol no fluido peritoneal e a expressão proteica da enzima aromatase nos tecidos implantados nos septos vaginais, nos intestinos e nos ligamentos uterossacros..... 36

Figura 14 – Níveis de expressão proteica de leptina e ObR nos três locais de acometimento mais frequentes dentre as pacientes do grupo endometriose..... 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados clínicos e hormonais das pacientes do grupo endometriose..... 27
Tabela 2 – Frequência dos focos peritoneais do grupo endometriose..... 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgRP	Peptídeo agouti
AOC	Anticoncepcional oral combinado
ASRM	*American society for reproductive medicine*
CA-125	Proteína antígeno do câncer 125
CART	Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CYP	Citocromo P450
DOU	Fundo de saco de Douglas
ERK	Proteínas quinases reguladas por sinais extracelulares
FSH	Hormônio folículo estimulante
IMC	Indice de massa corporal
INT	Intestino
IP3	Inositol-3-fosfato
IRS	Receptor de insulina
JAK	Janus-kinase
LEP	Gene codificador da leptina
LH	Hormônio luteinizante
LU	Ligamento uterossacro
MAPK	Proteino-quinases ativadas por mitógenos tipo k
MC-3R	Receptor de melanocortina 3
MC-4R	Receptor de melanocortina 4
mRNA	Rna mensageiro
NHA	Núcleo hipotalâmico arqueado
NHL	Núcleo hipotalâmico lateral
NHP	Núcleo hipotalâmico paraventricular
NHPF	Núcleo hipotalâmico perifornical
NHVM	Núcleo hipotalâmico ventromedial
NPY	Neuropeptídeo y
ObR	Receptor de leptina
OV	Ovario
POMC	Pró-opiomelanocortina
SHP-2	Enzima tirosina fosfatase 2
SOCS	Família das proteinas supressoras de sinalização de citocinas
STAT	Família das proteinas transdutoras e ativadoras de transcrição de sinal
SV	Septo vaginal
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRH	Hormônio liberador de tirotrofina
UT	Útero
α-MSH	Hormônio estimulante de melanócitos alfa

SUMÁRIO

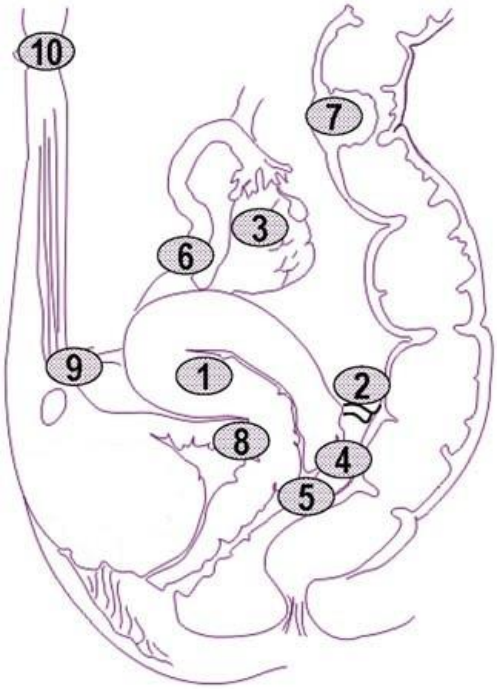
	INTRODUÇÃO	13
1	**OBJETIVOS**	25
1.1	**Objetivo geral**	25
1.2	**Objetivos específicos**	25
2	**METODOLOGIA**	26
2.1	**Pacientes**	26
2.2	**Obtenção das amostras**	28
2.3	**Determinação dos níveis hormonais: Leptina e estradiol**	28
2.4	***Western Blotting***	29
2.5	**Análise estatística**	30
3	**RESULTADOS**	31
4	**DISCUSSÃO**	38
	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de ética	52
	ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido	54
	ANEXO C - Artigo científico	55

INTRODUÇÃO

Aspetos gerais da endometriose

Endometriose é uma doença de inflamação crônica e progressiva, caracterizada pela implantação e crescimento de estroma e/ou epitélio glandular endometrial, em focos ectópicos extrauterinos (Vigano *et al.* 2004, Giudice 2010), tais como em ovários, tubas uterinas, ligamento uterossacro e redondo, parede peritoneal, região retrocervical, septo retrovaginal, intestino, bexiga e ureteres (Figura 1). Pode também acometer localizações mais incomuns, tais como o músculo diafragma, pulmões, pericárdio, ou, ainda, o cérebro (Gao *et al.* 2006, Ceccaroni *et al.* 2013, Huang *et al.* 2013). O tecido endometrial localizado nestes órgãos apresenta respostas aos hormônios ovarianos semelhantes às do endométrio eutópico, crescendo, modificando-se, descamando e sangrando.

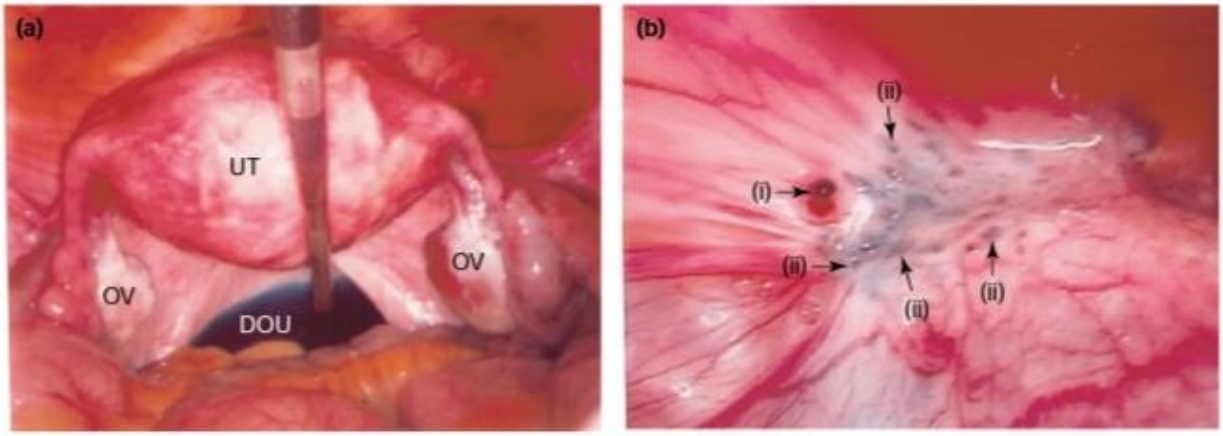
Figura 1. Possíveis locais de afecção por endometriose pélvica



1: Parede do miométrio uterino; 2: ligamento uterossacro; 3: ovário (superficiais, profundos e cistos com liquido achocolatado); 4: fundo de saco de Douglas; 5: septo retrovaginal; 6: tuba uterina; 7: parede do intestino; 8: bexiga: 9: canal inguinal; 10: parede abdominal. (Nitsch *et al.* 1988).

Embora a patogênese da endometriose ainda seja desconhecida, dentre as várias teorias estudadas, a explicação mais aceita é a da "menstruação retrógrada com fixação de fragmentos". Baseado nesta teoria, células endometriais eutópicas sofrem refluxo ao longo das tubas uterinas, chegando à cavidade peritoneal, aderindo no peritônio parietal e nas vísceras peritoneais (Figura 2), que juntamente com uma série de fatores imunológicos, estimulam a angiogênese, a proliferação e o crescimento celular (Donnez and Nisolle 1994, Matarese *et al.* 2003, Vercellini *et al.* 2007, Ozkan *et al.* 2008, Bulletti *et al.* 2010).

Figura 2. Imagens realizadas por vídeo-laparoscopia mostrando a região pélvica em seu estado normal



(a) e uma área do peritônio com múltiplas lesões endometrióticas associadas a várias ramificações vasculares (b). No peritônio endometriótico, dois tipos de diferentes focos de endometriose são visíveis na parede esquerda da pelve: (i) local de inflamação inicial em vermelho, onde o endométrio ectópico pode ser identificado, e (ii) lesões típicas em azul-preto, representando o efeito de processos inflamatórios e de remodelação, em que o tecido do endométrio ectópico não é sempre identificado, devido a acumulação de detritos e hemossiderina. Abreviações: UT: Útero; OV: Ovário; DOU: Fundo de saco de Douglas (Matarese *et al.* 2003).

A endometriose afeta cerca de 6% a 10% das mulheres em idade reprodutiva (ou seja, de 15 a 49 anos), o que corresponde a cerca de 176 milhões de mulheres no mundo e 30% deste grupo está associado à infertilidade primária ou secundária (Ozkan *et al.* 2008, Rogers *et al.* 2009).

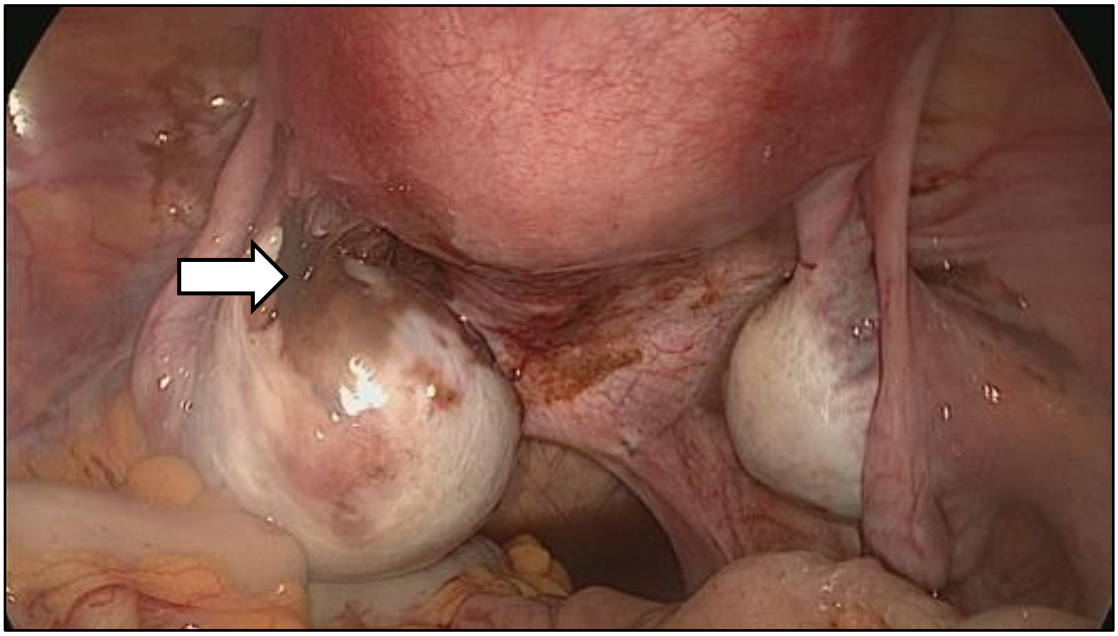
A doença pode começar cedo com a menarca, e a menopausa pode não resolver seus sintomas, especialmente se a mulher apresentar cicatrizes ou aderências da doença e/ou cirurgia.

A endometriose é diagnosticada em aproximadamente 25% das mulheres que se submetem à laparoscopia por motivo de dor pélvica e em 20% de mulheres inférteis (Lebovic *et al.* 2001). O quadro clínico caracteriza-se por dismenorreia progressiva (dor durante o período menstrual), dispareunia profunda (dor intensa durante a relação sexual) e sintomas intestinais e urinários cíclicos, como dor e/ou sangramento durante o período da menstruação, acompanhados por dor pélvica (ASRM, 1997). Em relação a endometriose e peso corporal há um consenso de que existe uma correlação inversa entre esses dois parâmetros (Cramer *et al.* 1986, Darrow *et al.* 1993, Signorello *et al.* 1997, Missmer *et al.* 2004, Parazzini *et al.* 2004, Ferrero *et al.* 2005, Hediger *et al.* 2005, Nagle *et al.* 2009).

Uma das causas de infertilidade, a endometriose, tem uma prevalência de 0,5-5% em mulheres férteis e 25-40% em mulheres inférteis. Trata-se de uma doença com grande impacto na qualidade de vida, embora 20-25% das pacientes sejam assintomáticas (Ozkan *et al.* 2008).

O endometrioma (Figura 3) é uma forma de apresentação localizada da endometriose, afetando principalmente os ovários (Matarese *et al.* 2000). Macroscopicamente apresenta-se como uma estrutura cística envolta por uma pseudocápsula com conteúdo líquido, espesso e achocolatado, cercado por áreas de fibrose e acomete 17-40% das mulheres com endometriose (Bulletti *et al.* 2010).

Figura 3. Foto realizada em videolaparoscopia mostrando a apresentação macroscópica do endometrioma ovariano



A seta indica o conteúdo de líquido espesso e achocolatado presente no interior do cisto (Foto: Dr. Marco Aurélio Pinho de Oliveira/UERJ).

A eficácia da terapia e a recorrência da doença são acompanhadas pela análise dos níveis séricos da proteína antígeno do câncer (CA-125), um biomarcador de malignidade do trato genital feminino (Szubert *et al.* 2012).

A extensão da doença varia de algumas pequenas lesões para grandes cistos ovarianos, podendo haver extensas áreas de fibrose em estruturas, como nos ligamentos uterossacro, com formação de aderências densas, causando distorção acentuada da anatomia pélvica.

A endometriose é classificada segundo a *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM, 1997) – revisada em 1996. Esta classificação gradua a endometriose em mínima (I, II, III) e grave (IV) 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 de Douglas (ASRM, 1997). O grau V, o qual foi avaliado neste estudo, é caracterizado pela presença de múltiplos implantes superficiais e profundos, incluindo endometriomas e aderências densas e firmes. Esta classificação, mesmo com algumas limitações, é de extrema utilidade para orientações no tratamento pós-cirúrgico, principalmente quando a paciente se queixa de infertilidade.

Com base em sintomas isolados, estabelecer o diagnóstico para endometriose, torna-se cada vez mais difícil, uma vez que a apresentação da doença é extremamente variável, existindo ainda sobreposição com outras condições, tais como a síndrome do intestino irritável e a doença inflamatória pélvica, podendo acarretar um atraso de alguns anos, entre o início dos sintomas e o diagnóstico final (Arruda *et al.* 2003).

O marcador CA-125 pode se apresentar elevado em pacientes com endometriose, principalmente nas pacientes com estágio avançado (Cheng *et al.* 2002), porém, o método com o maior índice de confiança é a visualização direta com confirmação histológica (Guerrero Hernandez *et al.* 2012).

Recentemente, um estudo (Jeong *et al.* 2013) avaliou o valor do diagnóstico e as características morfológicas de endometrioses profundas em tecidos reto/sigmoides, pelo método de colonografia por tomografia computadorizada, comparando com a ressonância magnética. Ambos os exames se mostraram sensíveis, no entanto, a taxa de alterações morfológicas nos tecidos mostrou-se mais visível pelo método de colonografia por tomografia computadorizada em relação a ressonância magnética nos casos que apresentaram obliterações no fundo de saco de Douglas.

A leptina

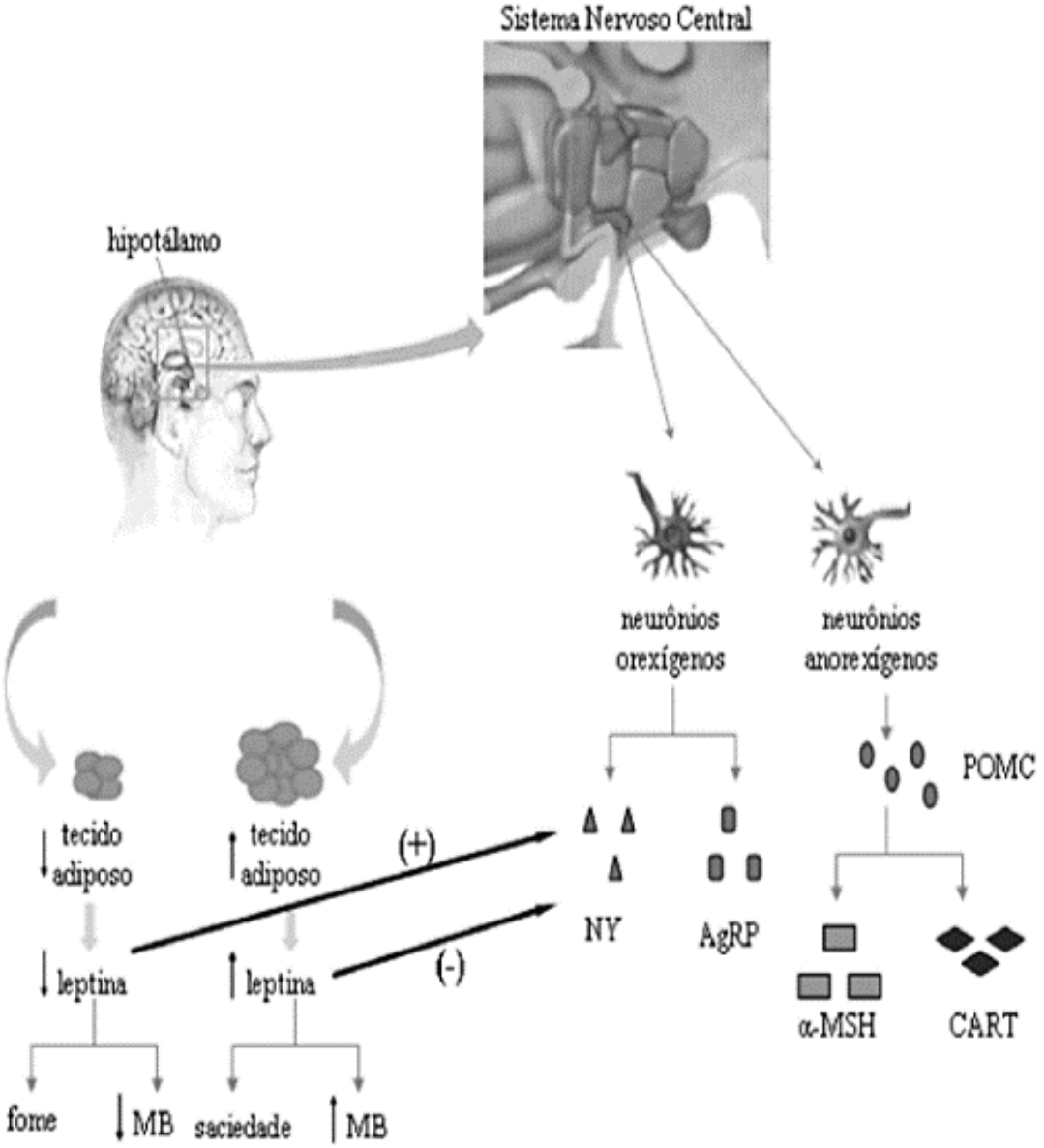
O gene ob, isolado por clonagem posicional, é responsável pela codificação de uma nova proteína denominada leptina (do grego *leptos*, significando “delgado”), um polipeptídeo não-glicosilado com 146 aminoácidos e peso molecular de 16 KDa. A forma precursora da proteína contém 167 aminoácidos e é ativada pela clivagem de 21 resíduos de aminoácidos, caracterizando, portanto, o gene codificador da leptina (LEP), em humanos, localizado no cromossomo 7 (7q31.3) (Zhang *et al.* 1994, Ogawa *et al.* 1995).

Primariamente, a ação da leptina ocorre em nível central, no núcleo hipotalâmico arqueado (NHA), em duas classes de neurônios distintas: os neurônios que expressam pró-opiomelanocortina (POMC), precursor do hormônio estimulante de melanócitos (α-MSH) e os neurônios que expressam um transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART). Tais substâncias são anorexigênicas, ou seja, reduzem a ingestão alimentar. A leptina estimula a produção dessas substâncias para manter o balanço energético negativo (Janeckova 2001, Hileman *et al.* 2002).

Já os neurônios orexigênicos, expressam o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo agouti (AgRP), e são relacionados ao aumento da ingestão alimentar e a eficiência metabólica para um menor dispêndio energético. O NPY é composto por 36 resíduos de aminoácidos, e é sintetizado principalmente no NHA, e se projeta para os núcleos hipotalâmicos paraventricular (NHP), ventromedial (NHVM), perifornical (NHPF) e lateral (NHL) núcleos estes, também envolvidos na regulação do balanço energético. O AgRP também é sintetizado no NHA e projetado para os NHP, NHVM e NHL. Ele age como análogo no sistema melanocortina, nos receptores MC-3R e MC-4R\\\\\\, estimulando a ingestão alimentar. A leptina age sobre os neurônios do NHA, inibindo a expressão e a síntese desses neuropeptídios (Niswender *et al.* 2001). Entre as ações promovidas pelos outros núcleos hipotalâmicos em relação à homeostase energética, pode-se destacar o NHVM como o centro da saciedade, NHL como o centro da fome e NHP ligado a efeitos para aumento do gasto energético, como produção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e o hormônio liberador de tirotrofina (TRH), ativadores do sistema nervoso simpático.

No NHF, há produção de peptídeos denominados orexinas do tipo A e B, que agem no NHVM, inibindo a saciedade e aumentando a ingestão. Essas áreas recebem axônios de núcleos de neurônios do NHA, POMC/CART e NPY/AgRP, sendo considerados áreas de ação secundária da leptina (Schwartz *et al.* 2000, Janeckova 2001) (Figura 4).

Figura 4. Ação central da leptina no balanço energético



Abreviações: MB: Metabolismo Basal; NY: Neuropeptídeo Y; AgRP: proteína relacionada a agouti; POMC: proteína derivada da propriomelanocortina; α-MSH: peptídeos de melanocortina; CART: peptídeo derivado da cocaína (Ribeiro *et al.* 2007).

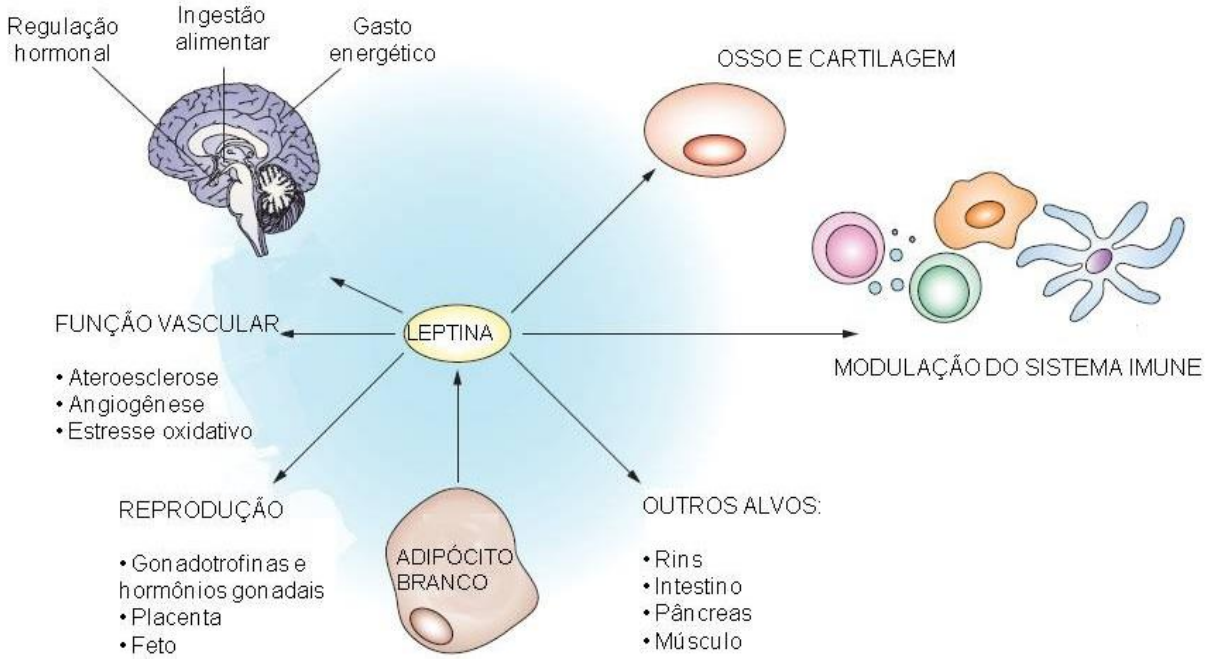
A função da leptina como reguladora no sistema nervoso central desencadeia uma cascata de sinalização, de modo a estimular e/ou inibir substâncias capazes de agir de forma direta ou indireta nas áreas hipotalâmicas envolvidas no controle do balanço energético (Schwartz *et al.* 2000).

A leptina é uma proteína pleiotrópica, secretada, principalmente, pelo tecido adiposo branco (Zhang *et al.* 1994) e, em concentrações menores, em outros sítios, como o hipotálamo, a hipófise, o músculo esquelético, o tecido ósseo, o endotélio arterial, os intestinos, os testículos, os ovários e a placenta (Masuzaki *et al.* 1997, Bado *et al.* 1998, Venner *et al.* 2006).

A leptina não é mais considerada apenas um hormônio isolado, responsável pela regulação do peso corporal, controlando a ingestão alimentar e o dispêndio energético, mas sim um mecanismo de sinalização integral, capaz de influenciar o adequado controle fisiológico de numerosas funções biológicas (La Cava *et al.* 2004).

Os efeitos da leptina na homeostase energética, bem como evidências da participação desta em várias funções fisiológicas (Figura 5), tais como regulação da função imune e tireoidiana, angiogênese, hematopoiese, desenvolvimento ósseo e reprodução (foco central deste estudo), já foi documentada na literatura (Flier 1998).

Figura 5. Representação esquemática da natureza pleiotrópica de leptina

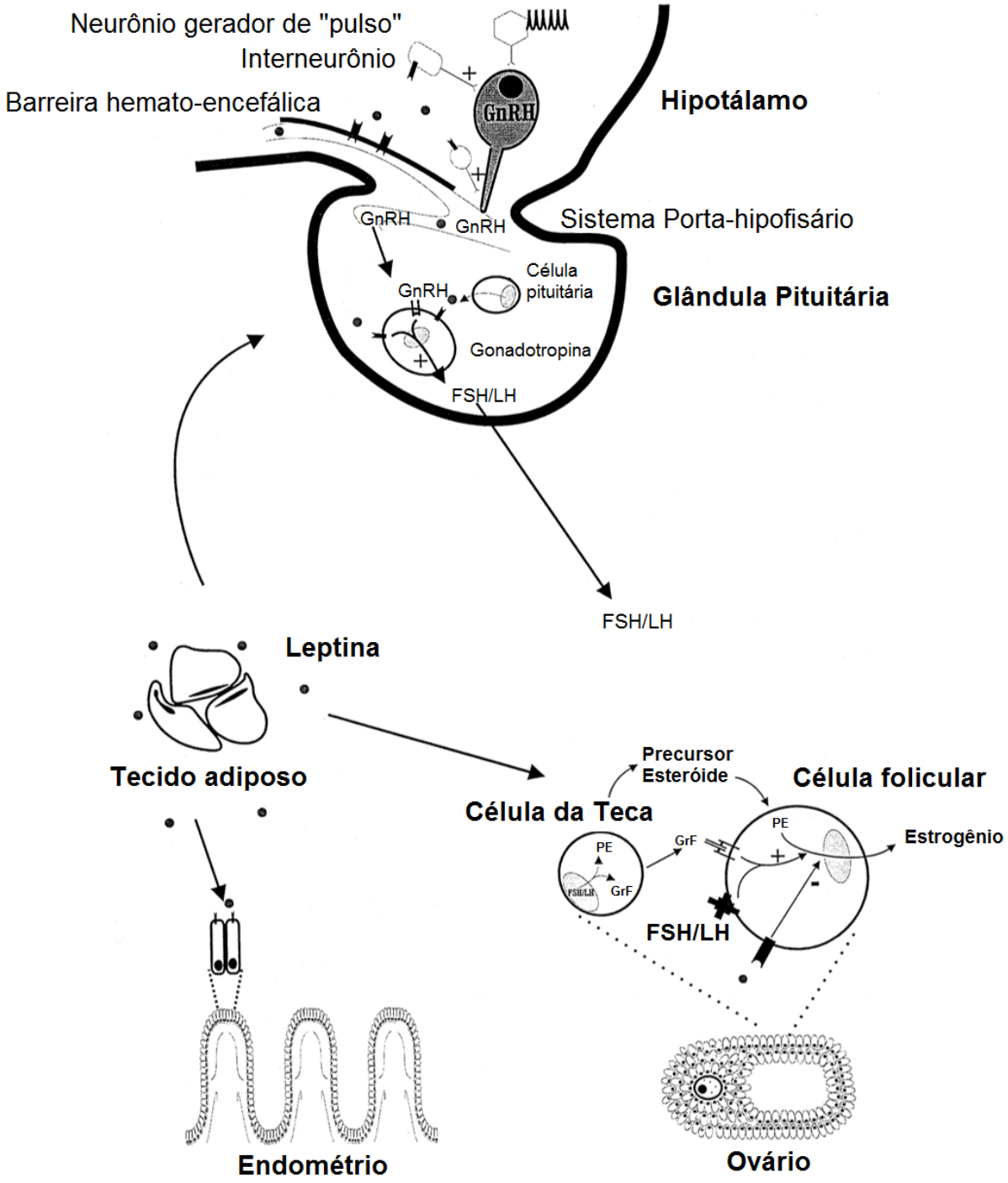


Desde sua descoberta por Zang e colaboradores em 1994, mais de mil artigos tem referenciado o tecido adiposo como um órgão chave no metabolismo, diversos aspectos da imunidade e inflamação e reprodução. Adaptado de Lago *e col*., 2007 (Lago *et al.* 2007).

A expressão e secreção da leptina é regulada por vários fatores, como por exemplo, pela insulina, glicocorticoides, TNF-α, associados ao aumento nos níveis de leptina, enquanto que a atividade β-adrenérgica, andrógenos, ácidos graxos livres e o hormônio do crescimento associam-se a redução da sua concentração (Margetic *et al.* 2002). Há também uma flutuação fisiológica nos níveis de leptina durante o ciclo menstrual, a qual é, significativamente menor no início da fase folicular (Hardie *et al.* 1997, Shimizu *et al.* 1997, Messinis and Milingos 1999).

Dados sugerem que a leptina pode regular a função hipotalâmica-hipófisária-ovariana (Gonzalez *et al.* 2000, Moschos *et al.* 2002) e que esta, sinalize metabolicamente o eixo reprodutivo, aumentando os níveis plasmáticos de hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) (Cunningham *et al.* 1999), regulando assim, a oscilação de LH e estradiol durante o ciclo menstrual (Licinio *et al.* 1998). Além disso, especula-se que o estradiol tenha um importante papel na regulação da produção de leptina pelos adipócitos (Shimizu *et al.* 1997) (Figura 6).

Figura 6. Diagrama esquemático ilustrando a interação da leptina com o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e o endométrio



(Moschos *et al.* 2002).

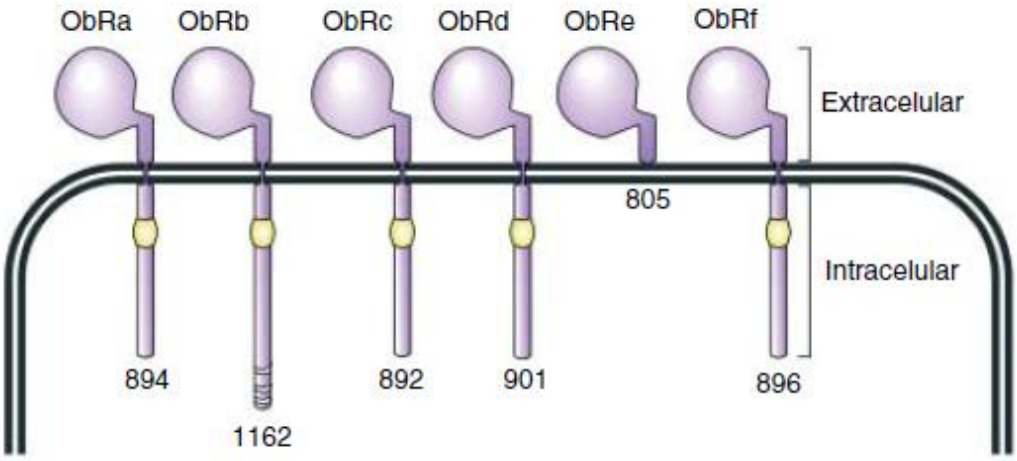
O receptor da leptina

O receptor de leptina (ObR) é produto do gene LEPR e possui diferentes alternativas de encadeamento, uma vez que seu RNA mensageiro, durante sua transcrição, é submetido a diferentes processos de retirada de *íntrons* (regiões não codificantes), denominados *splicing***,** gerando assim, quatro isoformas curtas – ObRa, ObRc, ObRd e ObRf – uma isoforma longa (ObRb) e uma isoforma circulante (ObRe) (Lee *et al.* 1996, Wang *et al.* 1996, Myers 2004).

O domínio extracelular das isoformas é igual, diferindo, entre elas, apenas o domínio intracelular, que varia de um tamanho de 805 a 1162 resíduos de aminoácidos característicos para cada isoforma (Figura 7).

A isoforma longa possui o domínio intracelular mais longo composto por três boxes: 1, 2 e 3, com um total de aproximadamente 300 resíduos de aminoácidos, que com isto, promove a interação com outras proteínas no citoplasma, ativando as vias de sinalização intracelular (Figura 7) sendo por isso, considerada a isoforma biologicamente funcional (Marroqui *et al.* 2012).

Figura 7. As seis isoformas do receptor da leptina obtidos por *splicing* alternativo, designados
ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe e ObRf



Os números apresentados na região intracelular indicam a quantidade de resíduos de aminoácidos característicos de cada isoforma. (Marroqui *et al.* 2012).

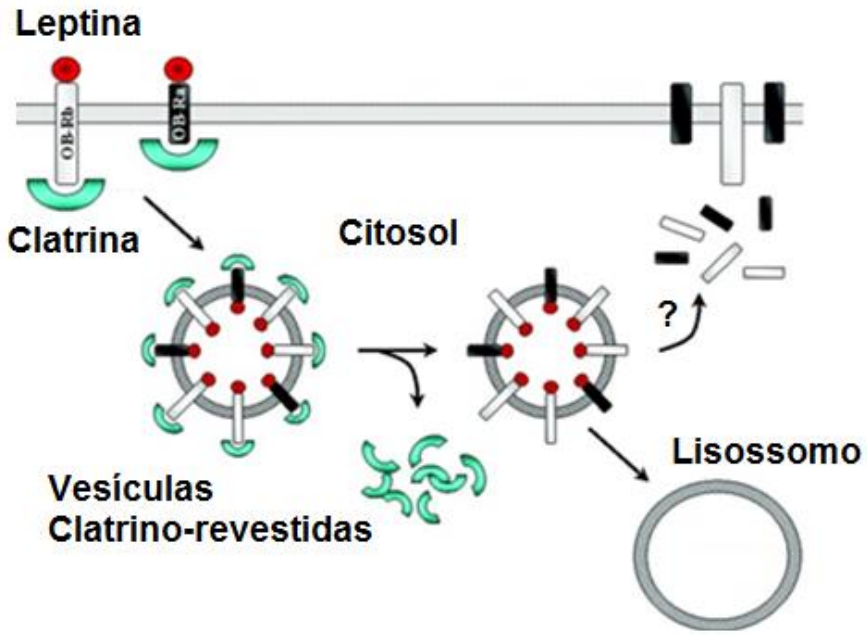
A isoforma longa do receptor de leptina é expressa principalmente no hipotálamo e responde às ações centrais desse peptídeo (Bjorbaek *et al.* 2001). Esta isoforma é considerada a principal forma de sinalização da leptina (Tartaglia *et al.* 1995, Tartaglia 1997), e está

presente também em outros tipos celulares, como no intestino (Buyse *et al.* 2001), estômago (Goiot *et al.* 2001), cordão umbilical e placenta (Akerman *et al.* 2002, Ebenbichler *et al.* 2002), ovário e endométrio (Karlsson *et al.* 1997, Kitawaki *et al.* 2000). As isoformas ObRa e ObRc são amplamente expressas no plexo coroide e em microvasos, onde possuem um papel na captação ou no efluxo da leptina do líquido cefalorraquidiano, assim como no transporte mediado pelos receptores de leptina através da barreira hemato-encefálica (Hileman *et al.* 2002, Bjorbaek and Kahn 2004). Já as isoformas ObRd e ObRf, não demonstram expressão bem determinadas nos tecidos corporais, parecendo estar distribuídos homogeneamente, embora sua representatividade seja baixa e suas funções ainda não descritas (Lee *et al.* 1996, Wang *et al.* 1996, Bjorbaek *et al.* 1997).

A isoforma ObRe, circula de forma sistêmica, acoplada a proteínas transportadoras, sendo esta constituída, exclusivamente, pelo domínio extracelular do receptor (Tartaglia *et al.* 1995, Tartaglia 1997, Myers 2004).

Esta classe de receptores é ativada a partir da ligação da leptina, na superfície celular, aos seus receptores, os quais são internalizados por meio de acoplamento de clatrinas e agrupados a vesículas lisossomais clatrino-revestidas. Após este processo, os receptores são degradados e/ou reciclados, retornando assim para a superfície celular (Figura 8) (Sweeney 2002).

Figura 8. Representação esquemática de internalização lisossomal e degradação do receptor longo (ObRb) e curto (ObRa) de leptina, via vesículas clatrino-revestidas.



(Fruhbeck 2006).

Leptina e endometriose

A endometriose é uma afecção ginecológica estrógeno-dependente. Uma doença poligênica e com etiologias multifatoriais e complexas. Atualmente, a leptina tem sido extremamente estudada em pacientes com esta patologia, devido as suas propriedades angiogênicas e seu envolvimento em funções do sistema reprodutor feminino. Alguns estudos relatam que a receptividade das células endometriais provenientes do útero pode estar relacionada com este hormônio (Alfer *et al.* 2000). Foi sugerido uma alteração do sistema "endométrio-leptina" em pacientes subférteis, porém, dados mais amplos sobre este fato são contraditórios (Alfer *et al.* 2000). No entanto, parece que não há diferença na expressão do RNAm do receptor de leptina em pacientes com endometriose, quando comparados com pacientes controles (Kitawaki *et al.* 2000). Comparando o endométrio eutópico em mulheres com e sem endomçetriose e o receptor de leptina parece ter baixa expressão no primeiro grupo (Kao *et al.* 2003). Foi relatado também um aumento da expressão de leptina no endométrio ectópico comparado ao eutópico (Wu *et al.* 2002) e que sua quantidade foi significativamente aumentada no fluido peritoneal de pacientes com endometriose (Matarese *et al.* 2000, De Placido *et al.* 2001). No entanto, os resultados são controversos, quando se trata dos níveis séricos de leptina. Embora Matarese e colaboradores (Matarese *et al.* 2000) tenham mostrado uma maior concentração de leptina sérica em mulheres com endometriose, outros autores observaram que as concentrações de leptina foram semelhantes em mulheres com e sem endometriose em qualquer fase do ciclo menstrual (Vigano *et al.* 2002, Wertel *et al.* 2005).

Embora haja novos e importantes papeis para o hormônio em questão na fisiologia reprodutiva, seu papel na etiologia da endometriose, atualmente ainda é incerto.

1 **OBJETIVOS**

1.1 **Objetivo geral**

Avaliar o papel potencial da proteína leptina na endometriose peritoneal em pacientes com endometriose classificada com grau IV (grau mais grave da doença) e comparar com um grupo controle sem histórico de doença reprodutiva.

1.2 **Objetivos específicos**

Avaliar os níveis de leptina no soro, no fluido peritoneal, e no liquido cístico do endometrioma;

Avaliar os níveis séricos do hormônio estradiol;

Avaliar a expressão da leptina e seu receptor e da enzima aromatase em focos ectópicos localizados no septo vaginal, no ligamento uterossacro e no intestino de pacientes com endometriose classificada com grau IV.

2 **METODOLOGIA**

2.1 **Pacientes**

Para composição dos dois grupos deste estudo, pacientes oriundas do ambulatório de ginecologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto – Rio de Janeiro (HUPE) foram selecionadas. O grupo endometriose constituiu de pacientes inférteis, submetidas à cirurgia por laparotomia ou laparoscopia, por quadro de infertilidade (primária ou secundária a pelo menos um ano, com fator masculino normal), dor pélvica, dispareunia, dismenorreia, ou massa anexial e exames de ressonância magnética e/ou ultrassonografia transvaginal sugestivos de endometriose. O grupo controle foi composto por pacientes férteis, submetidas a cirurgia de laqueadura, sem evidências cirúrgicas de endometriose ou outras doenças pélvicas.

As cirurgias foram realizadas entre fevereiro de 2013 e julho de 2013. Todas as pacientes estavam em idade reprodutiva e recebendo terapia hormonal (combinada ou de progesterona), e o IMC variou entre 20,4 a 25,4 Kg/m² no grupo endometriose (Tabela 1) e entre 20,1 a 25,7 no grupo controle. As pacientes do grupo controle também foram submetidas a terapia hormonal, porém como método contraceptivo.

Critérios de exclusão para a composição dos dois grupos de estudo foram: diabetes, doenças tireoidianas, hepáticas, clínica e/ou imagem por ultrassonografia sugestiva da síndrome do ovário policístico e qualquer outra patologia ovariana que não fosse o endometrioma diagnosticado no momento da cirurgia.

O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Pedro Ernesto (CEP.: 195.160 – Anexo A) e todas as pacientes, de ambos os grupos, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, obtendo todas as informações do presente estudo (Anexo B).

Tabela 1. Dados clínicos e hormonais das pacientes do grupo endometriose classificadas com grau IV

Identificação	Idade	Paridade	IMC	Medicação	Grau de Infertilidade
1	25	0	22,2 Kg/m²	Zoladex	Desconhecido
2	39	0	22,3 Kg/m²	AOC	Primária
3	28	Aborto	25,4 Kg/m²	AOC	Secundária
4	32	0	24,6 Kg/m²	AOC	Primária
5	34	Aborto	23,3 Kg/m²	AOC	Secundária
6	26	0	25,1 Kg/m²	AOC	Primária
7	34	0	24,8 Kg/m²	AOC	Primária
8	34	0	24,1 Kg/m²	AOC	Primária
9	30	1	21,4 Kg/m²	AOC	Secundária
10	39	0	25,4 Kg/m²	AOC	Primária
11	39	0	23,5 Kg/m²	AOC	Primária
12	35	0	25,4 Kg/m²	AOC	Primária
13	29	0	20,8 Kg/m²	AOC	Primária
14	35	Aborto	24,2 Kg/m²	Allurene	Secundária
15	34	0	20,4 Kg/m²	AOC	Primária

[1]AOC: Anticoncepcional Oral Combinado (Estrógeno + Progesterona)

[2]Allurene: Progesterona

[3]Zoladex: análogos de GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofina)

2.2 **Obtenção de amostras**

As amostras de sangue foram coletadas momentos antes da realização da anestesia em todos os casos (grupo endometriose e grupo controle). O fluido peritoneal foi aspirado da região do fundo de saco de Douglas no início das cirurgias. As biopsias foram realizadas nos implantes peritoneais (focos ectópicos) sugestivos de endometriose.

Foram encontrados focos nos seguintes órgãos pélvicos: intestino, bexiga, ligamento uterossacro, ligamento redondo, paramétrio, região retrocervical, tubas uterinas, ureteres, septo retrovaginal, além dos tecidos implantados no próprio peritônio parietal (parede abdominal).

Parte do material foi enviada ao serviço de patologia do Hospital Pedro Ernesto, onde confirmou-se a presença de células endometriais em todos os implantes. A outra parte, utilizada no estudo, foi armazenada em nitrogênio líquido durante o processo cirúrgico. No grupo endometriose, as pacientes com presença de endometrioma ovariano tiveram o líquido cístico (achocolatado) aspirado para posterior dosagem hormonal. Todo o material retirado foi, imediatamente, levado ao "Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular" do Instituto Biomédico da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, situado no prédio anexo ao HUPE, para armazenamento em freezer a -80ºC.

A extensão (profundidade) da endometriose foi classificada segundo os critérios da ASRM 1997.

2.3 **Determinação dos níveis hormonais: Leptina e Estradiol**

A dosagem hormonal nos fluidos peritoneais só foi possível ser realizada em nove pacientes, visto que houve perda do líquido no momento da cirurgia por dificuldade de aspiração por quantidade insuficiente de líquido na cavidade.

A dosagem de leptina no líquido cístico foi realizada em sete pacientes, pois é comum ocorrer extravasamento dos líquidos dos endometriomas ovarianos no momento da excisão (Koninckx *et al.* 2012). A dosagem hormonal no soro foi realizada em todas as pacientes incluídas no estudo.

A concentração (ng/mL) de leptina presente no soro, no fluido peritoneal (grupo endometriose e grupo controle) e no líquido cístico do endometrioma (grupo endometriose) foi determinada pelo método de ELISA (Millipore Corporation Billerica MA, EUA), onde as amostras dos líquidos císticos foram diluídas em uma proporção de 1:100. A leitura foi realizada seguindo as especificações do fabricante, no leitor de microplaca multi-modo FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Alemanha).

A concentração (pg/mL) do hormônio estradiol no soro e no fluido peritoneal (grupo endometriose e grupo controle), foram dosadas através do método de quimiluminescência no laboratório de hormônio do Hospital Universitário Pedro Ernesto.

Os níveis de sensibilidade para os ensaios foram 0,195 ng/mL para leptina e 5,00 pg/mL para estradiol.

2.4 ***Western Blotting***

Para a detecção de proteínas dos implantes peritoneais, cerca de quinhentos miligramas de tecido foram homogeneizados em 500 µL de tampão de lise contendo NP-40 a 1% (Amresco, Ohio, EUA) com inibidor de protease (Sigma-Aldrich, EUA), centrifugados a 9700 rpm a 4ºC. A dosagem de proteína foi realizada por detecção fluorométrica (Qubit 2.0, Life Technologies Corporation, CA, EUA).

Alíquotas de 20 µg de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS a 8% e submetidas a eletroforese vertical (150 mA, 50 V), transferidas para membranas de nitrocelulose (80 mA, 4V) em cuba semi-seca, e após, incubadas com anticorpos (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) para leptina (diluição 1:500), ObR (diluição 1:200) e para a enzima aromatase (diluição 1:250, Abcam, RU). Tanto os tipos e as concentrações dos anticorpos secundários utilizados para as marcações, foram escolhidos de acordo com a indicação dos fabricantes referentes a cada anticorpo primário citado.

A expressão das proteínas em estudo foi normalizada pela expressão de da proteína constituinte β-actina de todas as pacientes. A revelação das bandas foi realizada pelo método de quimioluminescência (ECL, Amershan BioSciences, PiC at away, NJ, EUA), e foto-documentada pelo sistema ChemiDoc MP System, Bio-Rad da empresa Life Science Research, EUA. As quantificações de todas as bandas detectadas foram feitas através do software Image J 1.42q, EUA.

2.5 **Análise Estatística**

Para a análise dos resultados deste estudo, foi utilizado programa GraphpadPrism (versão 6.0, Graphpad Software, CA, EUA), onde os dados foram testados para a normalidade e homogeneidade de variâncias. A correlação de Pearson foi feita para análise de alguns parâmetros e as diferenças estatísticas foram avaliadas por análise de variância através do teste One-way ANOVA com pós-teste de Holm-Sidak.

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média, onde o valor de $p<0,05$ foi considerado como significativo estatisticamente.

3 **RESULTADOS**

Em todas as pacientes submetidas a cirurgia para endometriose que participaram do estudo, foram encontrados diversos focos pélvicos incluindo: intestino, bexiga, ligamento uterossacro, ligamento redondo, paramétrio, região retrocervical, tubas uterinas, ureteres, septo retrovaginal, além dos tecidos implantados no próprio peritônio parietal (parede abdominal).

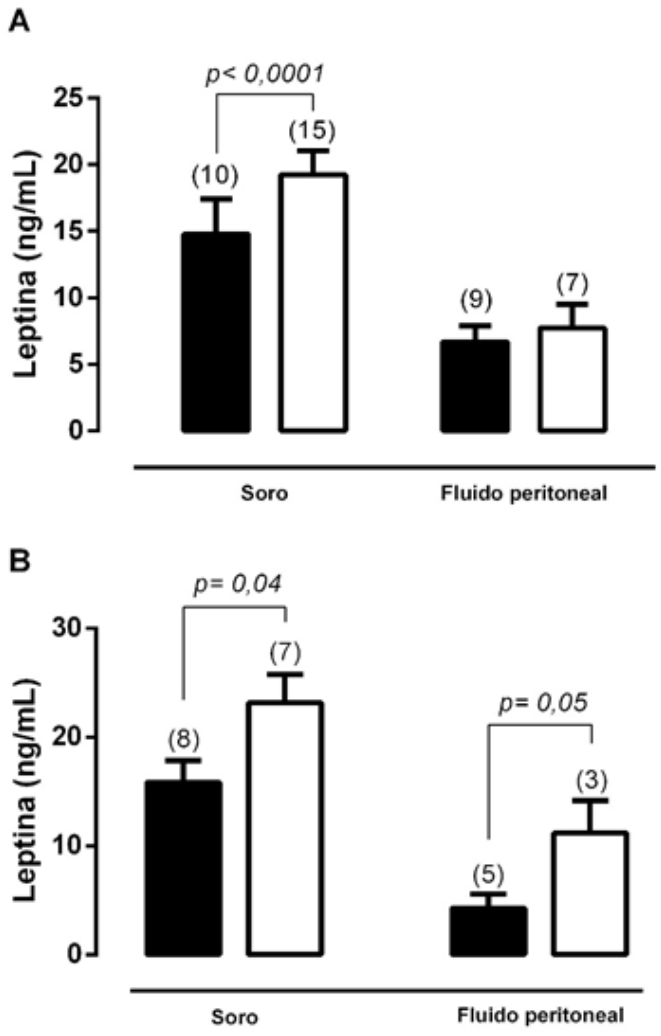
A tabela 2 mostra a frequência de cada foco no número total das pacientes incluídas nesse estudo. Vale ressaltar que os focos mais frequentes foram aqueles aderidos ao intestino, ligamento uterossacro e septos vaginais.

Tabela 2. Frequência dos focos peritoneais do grupo endometriose

Focos peritoneais	Frequência
Ligamento uterossacro	9 (24,4%)
Intestino	8 (21,6%)
Septo vaginal	5 (13,5%)
Tuba uterina	4 (10,8%)
Bexiga	3 (8,1%)
Ligamento redondo	2 (5,4%)
Paramétrio	2 (5,4%)
Peritônio parietal	2 (5,4%)
Região retrocervical	1 (2,7%)
Ureter	1 (2,7%)

A figura 9 mostra os níveis de leptina no soro e no fluido peritoneal. Considerando as 15 pacientes, o grupo endometriose apresentou níveis de leptina sérica significativamente mais altos em relação ao grupo controle (controle=14,7ng/mL±2,6, endometriose=19,2ng/mL±1,8, $p<0,0001$). Em contraste, os níveis de leptina nos fluidos peritoneais não apresentaram diferença significativa (controle=6,7ng/mL±1,2, endometriose=7,7ng/mL±1,8, $p= 0,2$) (Figura 9A). Entretanto, quando comparamos, mulheres com e sem endometrioma ovariano, observamos um aumento nos níveis de leptina no soro e no fluido peritoneal nas pacientes sem endometrioma ovariano (soro: com endometrioma=15,85ng/mL±1,99, sem endometrioma=23,1ng/mL±2,6, $p=0,04$; fluido peritoneal: com endometrioma=4,28ng/mL±1,30, sem endometrioma= 11,2ng/mL±3, $p=0,05$) (Figura 9B).

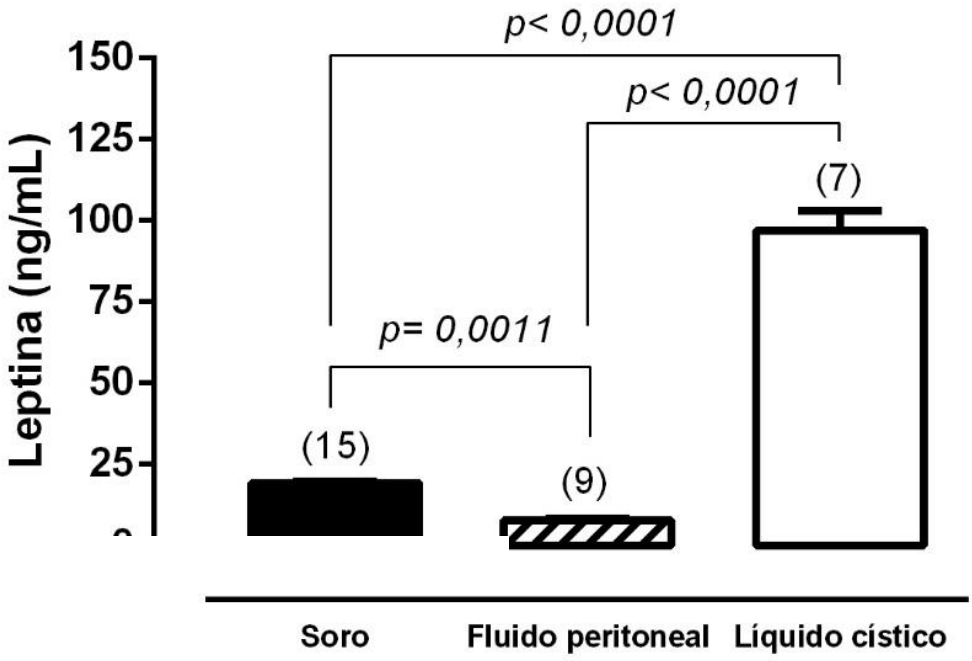
Figura 9. Níveis de leptina no soro e no fluido peritoneal dos grupos controle (barra preta) e endometriose (barra branca)



(A). Níveis de leptina no soro e no fluido peritoneal das pacientes do grupo endometriose com a presença de endometrioma ovariano (barra preta) e sem endometrioma ovariano (barra branca) (B). Os números entre parênteses correspondem ao número da amostra. Dados expressos como média ± erro padrão da média.

Ao compararmos apenas o grupo endometriose (Figura 10), observamos que as amostras de líquido cístico do endometrioma apresentam níveis de leptina significativamente mais elevados que o soro ($p<0,0001$) e o fluido peritoneal ($p<0,0001$). Além disto, os níveis de leptina são significativamente mais elevados no soro quando comparados ao fluido peritoneal ($p=0,0011$).

Figura 10. Níveis de leptina no soro, no fluido peritoneal e no líquido cístico do endometrioma
no grupo endometriose.



Os números entre parênteses correspondem ao número da amostra. Dados expressos como média ± erro padrão da média.

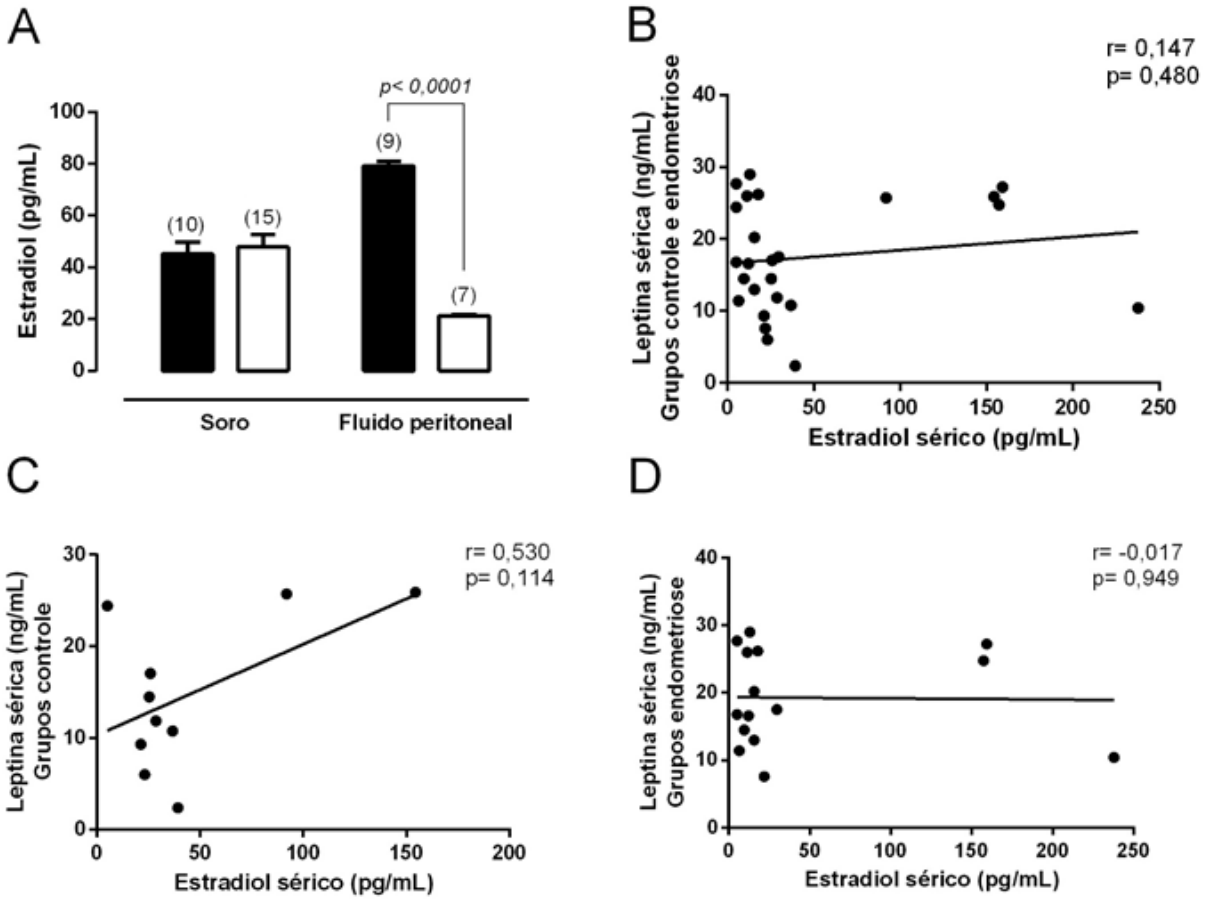
Os níveis de estradiol são mostrados na figura 11. Não observamos diferença nos níveis séricos de estradiol entre os grupos controle e endometriose (controle=45,2pg/mL±14,1, endometriose=47,8pg/mL±18,9, p=0,9). No entanto, em relação ao fluido peritoneal, o grupo endometriose apresentou níveis significativamente menores de estradiol comparado ao grupo controle (controle=79,2pg/mL±42,3, endometriose=21,1pg/mL±1,5, p<0,0001) (Figura 11A).

Não foi observada correlação entre níveis séricos de leptina e níveis séricos de estradiol, considerando ambos os grupos, controle e endometriose (figura 11B), apenas o grupo controle (figura 11C) ou ainda, apenas o grupo endometriose (figura 11D).

Em relação a expressão proteica da enzima aromatase, houve uma maior expressão nos focos ectópicos implantados nos septos vaginais, quando comparados aos implantes nos ligamentos uterossacros (níveis de expressão intermediários entre os três focos) e nos intestinos (menores níveis de expressão). No entanto, apenas o resultado entre os focos

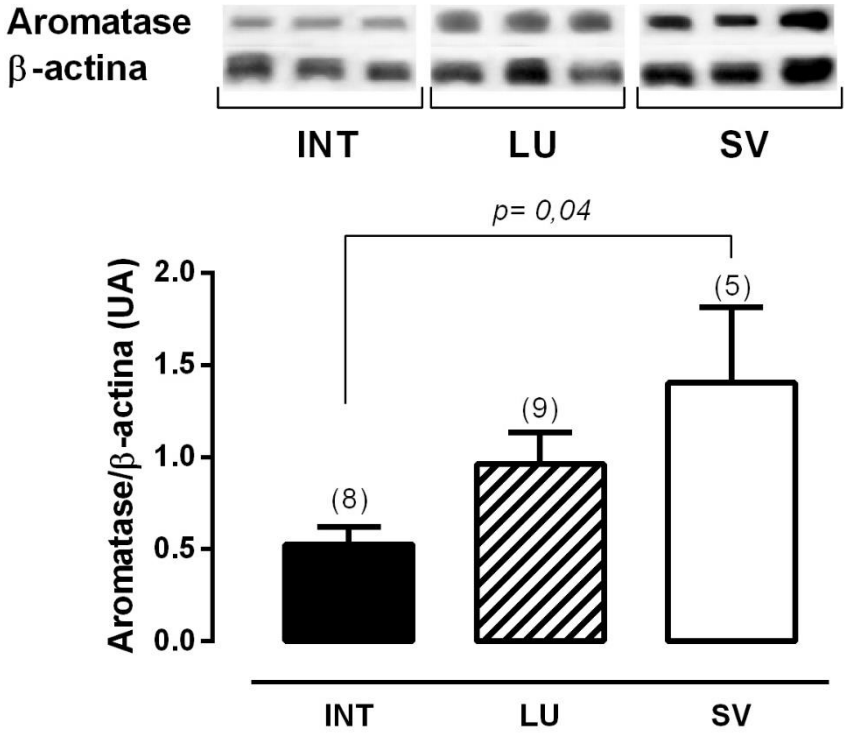
ectópicos situados nos septos vaginais e aqueles nos intestinos mostraram diferença significativa (p=0,04) (Figura 12).

Figura 11. Níveis de estradiol sérico no grupo controle (barra preta) e endometriose (barra branca)



Legenda: (A). Dados expressos como média ± erro padrão da média. Correlações de Pearson entre leptina sérica e estradiol sérico em ambos os grupos (B), no grupo controle (C), no grupo endometriose (D). Os números entre parênteses correspondem ao número da amostra. Valores de r e p estão mostrados nos gráficos.

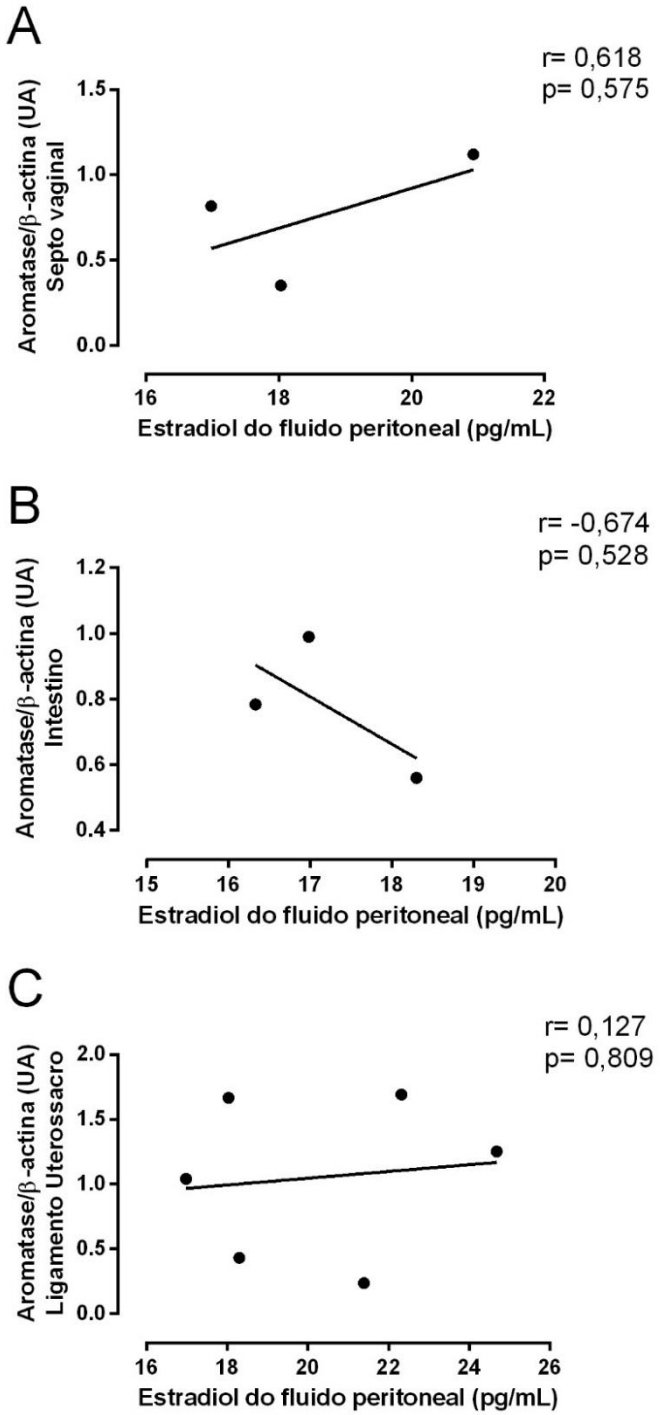
Figura 12. Níveis de expressão proteica da enzima aromatase nos três locais de acometimento mais frequentes dentre as pacientes do grupo endometriose.



Os números entre parênteses correspondem ao número da amostra. Dados expressos como média ± erro padrão da média. Siglas: INT: Intestino; LU: Ligamento Uterossacro; SV: Septo Vaginal.

A figura 13 mostra a correlação entre a expressão proteica da enzima aromatase nos três focos peritoneais estudados com os níveis de estradiol nos fluidos peritoneais de suas respectivas pacientes. Observamos nos implantes dos septos vaginais (onde há uma maior expressão desta proteína), uma correlação positiva e moderada (r=0,618; p=0,575) (Figura 13A), enquanto que, nos tecidos implantados nos intestinos (onde há menor expressão da proteína aromatase), observou-se uma correlação negativa e moderada (r=-0,674; p=0,528) (Figura 13B). E por fim, os tecidos endometriais implantados nos ligamentos uterossacros, não apresentaram correlação com os níveis de estradiol no fluido peritoneal (r=0,127; p=0,809) (Figura 13C), porém nenhuma das correlações foi estatisticamente significativa.

Figura 13. Correlação de Pearson entre os níveis de estradiol no fluido peritoneal e a expressão proteica da enzima aromatase nos tecidos implantados nos septos vaginais

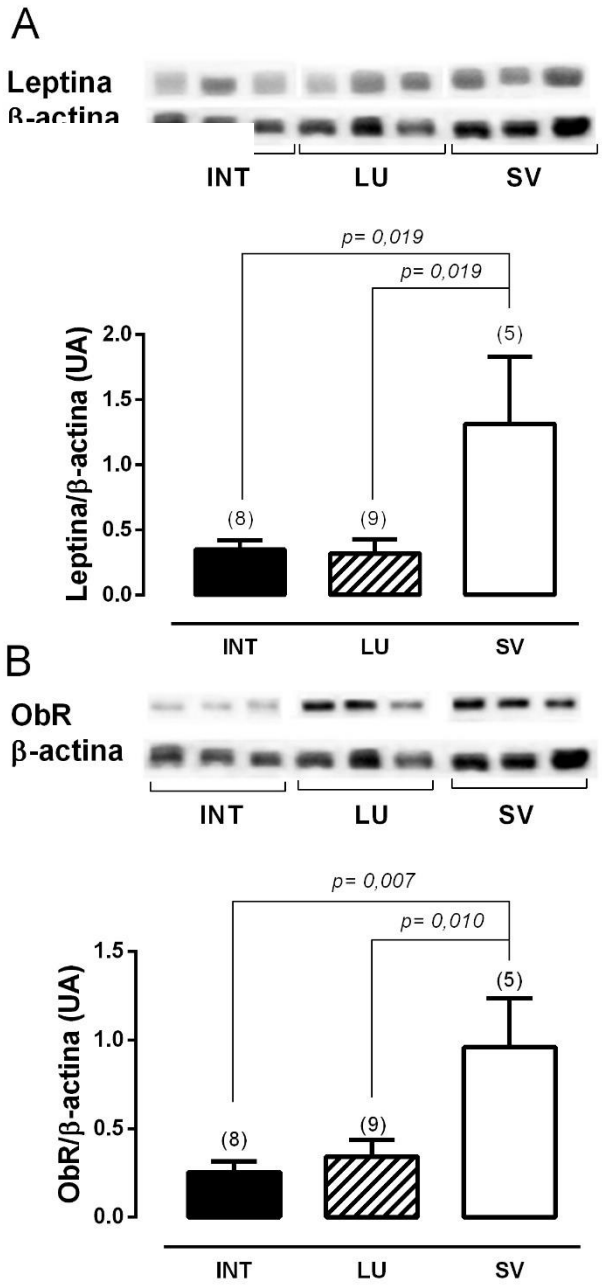


(A), nos intestinos (B) e nos ligamentos uterossacros (C). Valores de r e p estão mostrados nos gráficos.

Em relação à expressão proteica de leptina e ObR, observamos que tanto a expressão de leptina (Figura 14A) quanto a do seu receptor (Figura 14B) foi significativamente maior

nos focos peritoneais implantados nos septos vaginais em relação aos focos implantados nos intestinos (menores níveis) e nos ligamentos uterossacros (níveis intermediários em relação aos três focos peritoneais).

Figura 14. Níveis de expressão proteica de leptina (A) e ObR (B) nos três locais de acometimento mais frequentes dentre as pacientes do grupo endometriose



Os números entre parênteses correspondem ao número da amostra. Dados expressos como média ± erro padrão da média. Siglas: INT: Intestino; LU: Ligamento Uterossacro; SV: Septo Vaginal.

4 **DISCUSSÃO**

Como mostra a literatura (Vigano *et al.* 2004, Gao *et al.* 2006, Giudice 2010, Ceccaroni *et al.* 2013, Huang *et al.* 2013), os focos de afecção da doença são vários e nas pacientes incluídas nesse estudo mostraram-se bastante variáveis sendo os mais frequentes aqueles aderidos nos intestinos, nos ligamentos uterossacros e nos septos vaginais e por esta razão esses focos foram os escolhidos para as análises de expressão proteica.

É válido ressaltar que todas as pacientes incluídas neste trabalho foram classificadas como "endometriose severa" (Grau IV) e estavam sob uso de terapia hormonal para reduzir o viés que existe entre os diferentes graus de severidade da doença e a variação hormonal do ciclo menstrual. Esse critério acarretou em um tamanho amostral pequeno, considerando algumas perdas amostrais ocorridas durante as cirurgias. Tais perdas, como o extravasamento do líquido cístico do endometrioma, no momento da cirurgia, são comuns de acontecer e estão relatadas na literatura (Koninckx *et al.* 2012). Sabemos que aumentando o tamanho do nosso "n" amostral, poderiamos aumentar a validade do nosso estudo, especialmente para as variáveis que não foram significativas, assim, podemos considerar o tamanho da nossa amostra como um fator limitante para este estudo.

A relação entre leptina e endometriose é um assunto que vem sendo muito estudado na tentativa de entender o papel desse hormônio na etiologia da doença. Encontramos trabalhos com resultados controversos que avaliam os níveis de leptina no soro e/ou no fluido peritoneal, de pacientes com endometriose (Matarese *et al.* 2000, De Placido *et al.* 2001, Vigano *et al.* 2002, Mahutte *et al.* 2003, Bedaiwy *et al.* 2006, Barcz *et al.* 2008, Bricou *et al.* 2008, Alviggi *et al.* 2009), no entanto, poucos citam implantes peritoneais em suas análises, e não identificam suas localizações, ou ainda, tratam apenas como endometriose (Kitawaki *et al.* 2000, Kao *et al.* 2003, Lima-Couy *et al.* 2004, Wu *et al.* 2007, Nacul *et al.* 2013, Oh *et al.* 2013). Ainda, na maioria desses trabalhos grupos considerados como controle incluíam mulheres inférteis de causa desconhecida (Matarese *et al.* 2000, De Placido *et al.* 2001, Vigano *et al.* 2002), submetidas a ligadura tubária (Matarese *et al.* 2000, De Placido *et al.* 2001, Bedaiwy *et al.* 2006, Tao *et al.* 2011), presença de massa anexial (Vigano *et al.* 2002), presença de miomas (Tao *et al.* 2011), e ainda, outras patologias diferentes de endometriose (Kitawaki *et al.* 2000, De Placido *et al.* 2001, Bedaiwy *et al.* 2006).

O índice de massa corporal (IMC) das pacientes em questão, foi considerado como um critério de inclusão. A faixa determinada foi de 20 a 30 Kg/m^2, o que inclui pacientes

consideradas normais e com sobrepeso, com uma predominância das pacientes com o IMC normal, já que a endometriose é mais frequente em mulheres com índices de massa corporal menor (Monajemzadeh *et al.* 2013, Shah *et al.* 2013)

Outro critério de inclusão foi o uso de contraceptivos hormonais. O uso da terapia hormonal bloqueia o eixo hipotálamo-hipófise-ovariano durante todo o ciclo, mantendo os ovários em repouso, imunes às flutuações hormonais cíclicas (Teirmaa *et al.* 1998). Assim, todas as pacientes que estavam recebendo terapia hormonal para o tratamento clínico de endometriose ou no caso do grupo controle, como método contraceptivo foram incluídas no estudo. Nossos resultados não apresentaram diferença significativa entre os níveis séricos de estradiol nos grupos controle e endometriose, confirmando a eficácia da terapia hormonal.

A leptina tem sido considerada atualmente um importante regulador do sistema reprodutor (Bluher and Mantzoros 2007) e vários estudos têm sido realizados com objetivo de entender o papel da leptina na etiologia da endometriose. Devido às diferenças na escolha dos pacientes utilizados nos estudos (gravidade da doença e uso ou não de terapia hormonal) os resultados encontrados na literatura são controversos. Os níveis séricos de leptina encontram-se inalterados quando comparado a um grupo controle de mulheres em idade reprodutiva, com exame laparoscópico normal (Vigano *et al.* 2002, Wertel *et al.* 2005). Foi também demonstrado níveis elevados de leptina sérica nas pacientes portadoras de endometriose comparado a um grupo controle (Matarese *et al.* 2000).

A leptina, um hormônio produzido, principalmente, pelos adipócitos (Zhang *et al.* 1994), é também expresso no endométrio e tem desempenhado um importante papel na doença endometriose (Kitawaki *et al.* 2000). O interesse em se entender qual a associação entre a leptina e a endometriose tem crescido bastante nos últimos anos. Uma descoberta interessante, no que diz respeito à leptina e à endometriose, foi que pacientes que apresentam implantes peritoneais em todos os estágios da doença, apresentam concentrações mais elevadas de leptina no fluido peritoneal do que mulheres em que não foram observados tais implantes, sugerindo que a leptina pode desempenhar um papel no desenvolvimento da endometriose peritoneal (De Placido *et al.* 2001).

No entanto, estudos encontrados na literatura sobre este tema são controversos, fato este que julgamos estar relacionado com a variabilidade da composição dos grupos controles em cada trabalho. As pacientes incluídas nestes grupos, geralmente, foram submetidas a cirurgias para a infertilidade sem causa conhecida (Matarese *et al.* 2000, De Placido *et al.* 2001, Vigano *et al.* 2002), por laqueadura tubária (Matarese *et al.* 2000, De Placido *et al.* 2001, Bedaiwy *et al.* 2006, Tao *et al.* 2011), presença de miomas (Tao *et al.* 2011), ou outras

patologias diferentes de endometriose (Kitawaki *et al.* 2000, De Placido *et al.* 2001, Bedaiwy *et al.* 2006).

Estudos que avaliaram níveis de leptina no soro e no fluido peritoneal de pacientes com endometriose, reportam resultados conflitantes: níveis elevados em ambos os grupos (Matarese *et al.* 2000, De Placido *et al.* 2001, Mahutte *et al.* 2003, Bedaiwy *et al.* 2006, Gungor *et al.* 2009, Wu *et al.* 2010), ou ainda sem alteração (Vigano *et al.* 2002, Wertel *et al.* 2005, Barcz *et al.* 2008, Gungor *et al.* 2009, Tao *et al.* 2011).

Neste estudo, mostramos que pacientes com endometriose apresentam altos níveis de leptina no soro, enquanto que esses níveis nos líquidos peritoneais foram inalterados em comparação ao grupo controle. Não encontramos na literatura, nenhum estudo que tenha avaliado apenas pacientes no estágio IV da doença. Mais uma vez, acreditamos que a variabilidade entre os estudos, em relação aos critérios de inclusão de pacientes sejam responsáveis para a discrepância dos resultados. Acreditamos que essa seja a primeira vez que os níveis de leptina são avaliados no fluido cístico de endometrioma. Nossos resultados mostram que os níveis de leptina são muito altos neste compartimento comparado com o soro e o fluido peritoneal.

Analisando a leptina em mulheres, com endometriose peritoneal, com e sem implante ovariano (endometrioma), observamos que na endometriose peritoneal sem implante de ovário, os níveis de leptina no soro e no fluido peritoneal foram maiores do que em mulheres com implante ovariano, corroborando os dados já descritos na literatura (De Placido *et al.* 2001). Estes dados sugerem que a presença da doença peritoneal, porém sem implante nos ovários, é um fator que influencia a concentração de leptina nos fluidos. Poderíamos supor também que, a leptina produzida pelo endometrioma, poderia ser sequestrada para o cisto endometrial em vez de migrar para o soro e/ou para o fluido peritoneal.

A regulação da leptina por esteroides é outro ponto controverso. Dados de estudos com modelos experimentais, sugerem que esteroides gonadais modulam a expressão de leptina (Murakami *et al.* 1995, Slieker *et al.* 1996, Shimizu *et al.* 1997). As concentrações de leptina são maiores entre as mulheres do que entre os homens, diferença esta que pode ser explicada pelo aumento dos depósitos de gordura em mulheres que são, na maioria das vezes, maiores que dos homens (Haffner *et al.* 1997, Castracane *et al.* 1998). Os níveis de leptina em mulheres na pré-menopausa são mais elevados do que aqueles em mulheres pós-menopáusicas (Rosenbaum *et al.* 1996). Além disso, estudos também demonstram que a proteína leptina também pode variar durante o ciclo menstrual (Hardie *et al.* 1997, Shimizu *et al.* 1997), ou não, mesmo em mulheres em terapia hormonal (Tataranni *et al.* 1997, Teirmaa

et al. 1998, Matarese *et al.* 2000). Não houve diferença nos níveis séricos de estradiol entre os grupos deste estudo, confirmando assim a eficácia da terapia hormonal em que todas as pacientes do estudo estavam submetidas. No entanto, o grupo endometriose apresentou níveis mais baixos de estradiol no fluido peritoneal em relação ao grupo controle.

Sabendo que os tecidos endometrióticos ectópicos tem a capacidade de produzir estrogênio (Bulun *et al.* 1999, Bulun *et al.* 2000), avaliamos a expressão proteica da enzima aromatase nos implantes peritoneais, tendo em vista que a aromatase, uma proteína membro do citocromo P450 (CYP), da superfamília da enzima monooxigenase, é a enzima crítica para a síntese de estrogênios, onde o seu complexo catalisa a transformação de androgênios em estradiol e estrona (Simpson *et al.* 1994).

A aromatase mostrou-se mais expressa nos tecidos implantados nos septos vaginais e menos expressa nos implantados nos intestinos, enquanto, nos implantes dos ligamentos uterossacros, apresentou valores intermediários.

Apesar de uma correlação não significativa entre a expressão proteica da aromatase em cada tecido endometrial implantado nos focos estudados e o nível de estradiol do fluido peritoneal (provavelmente pelo pequeno número de amostras), os resultados sugerem uma correlação positiva no septo vaginal e negativa no intestino, indicando que o estradiol sintetizado em cada implante seja liberado para o fluido de maneira proporcional a sua síntese. No entanto, essa análise não nos permite explicar o porquê da concentração de estradiol do fluido peritoneal, no grupo endometriose, ser menor, do que no grupo controle.

Em relação à expressão proteica de leptina e de ObR, os resultados foram muito semelhantes com os da enzima aromatase. Ambos, foram superiores nos septos vaginais em comparação com os tecidos implantados nos intestinos. Tecidos endometriais implantados nos ligamentos uterossacros expressaram valores médios para as duas proteínas. Um artigo recentemente publicado (Nacul *et al.* 2013) mostrou que os implantes peritoneais expressam alta concentração de RNAm de leptina e ObR no endométrio ectópico.

Não encontramos na literatura, nenhum estudo que compara a expressão proteica da enzima aromatase, da leptina e de ObR entre os diferentes implantes peritoneais ectópicos. No entanto, podemos sugerir que, devido às propriedades imunológicas e angiogênicas da proteína leptina (Ryan *et al.* 1995, Suganami *et al.* 2004), a elevada expressão de tais proteínas pode ser, de algum modo, responsável pela migração e orientação do endométrio ectópico ao seu local de implantação.

Transtornos causados pela deficiência ou o excesso da proteína leptina nos fluidos corporais e/ou tecidos, levaram à motivação de cientistas a desenvolverem fármacos que

podem ativar ou inibir o receptor (ObR) desta citocina (Otvos *et al.* 2008). Recentemente, em setembro de 2012, foi realizado um pedido de patente, com o registro WO-2012129228-A2, pela descoberta de um peptídeo capaz de impedir a sinalização do receptor ObR em células responsivas a leptina. Esse peptídeo, antagonista da leptina, liga-se ao receptor, não ativando suas vias de sinalização. O desenvolvimento de uma "leptina mutante" com propriedades antagonistas e outras proteínas que bloqueiam a atividade da leptina poderão também gerar novas descobertas para a pesquisa em endometriose (Teirmaa *et al.* 1998) e, eventualmente, para o tratamento clínico desta patologia.

Acreditamos que o modelo proposto por nós é mais homogêneo, já que as pacientes de ambos os grupos estavam sob terapia hormonal, o grupo controle não apresentou qualquer indício de doença do sistema reprodutor e estudamos três focos peritoneais diferentes, tornando este trabalho inédito e fazendo com que ele contribua com dados que podem ajudar a esclarecer o papel da leptina na fisiopatologia da endometriose.

CONCLUSÃO

De acordo com os dados encontrados neste estudo, concluímos que a presença da doença peritoneal e não o endometrioma é o fator que influencia a concentração da proteína leptina presente no soro e no fluido peritoneal em pacientes com endometriose de grau IV. Em adição, as diferenças nos níveis de expressão de leptina, ObR e aromatase entre os diferentes locais de implantação do tecido endometrial ectópico sugerem a possibilidade de estas proteínas estarem envolvidas na localização de implantação do endométrio ectópico.

REFERÊNCIAS

Akerman, F., Z. M. Lei and C. V. Rao (2002). "Human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor genes." Gynecol Endocrinol 16(4): 299-306.

Alfer, J., F. Muller-Schottle, I. Classen-Linke, U. von Rango, L. Happel, K. Beier-Hellwig, W. Rath and H. M. Beier (2000). "The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility." Mol Hum Reprod 6(7): 595-601.

Alviggi, C., R. Clarizia, G. Castaldo, G. Matarese, C. C. Colucci, S. Conforti, T. Pagano, A. Revelli and G. De Placido (2009). "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 25(9): 610-615.

Arruda, M. S., C. A. Petta, M. S. Abrao and C. L. Benetti-Pinto (2003). "Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women." Hum Reprod 18(4): 756-759.

Bado, A., S. Levasseur, S. Attoub, S. Kermorgant, J. P. Laigneau, M. N. Bortoluzzi, L. Moizo, T. Lehy, M. Guerre-Millo, Y. Le Marchand-Brustel and M. J. Lewin (1998). "The stomach is a source of leptin." Nature 394(6695): 790-793.

Barcz, E., L. Milewski, D. Radomski, P. Dziunycz, P. Kaminski, P. I. Roszkowski and J. Malejczyk (2008). "A relationship between increased peritoneal leptin levels and infertility in endometriosis." Gynecol Endocrinol 24(9): 526-530.

Bedaiwy, M. A., T. Falcone, J. M. Goldberg, R. K. Sharma, D. R. Nelson and A. Agarwal (2006). "Peritoneal fluid leptin is associated with chronic pelvic pain but not infertility in endometriosis patients." Hum Reprod 21(3): 788-791.

Bjorbaek, C., R. M. Buchholz, S. M. Davis, S. H. Bates, D. D. Pierroz, H. Gu, B. G. Neel, M. G. Myers, Jr. and J. S. Flier (2001). "Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors." J Biol Chem 276(7): 4747-4755.

Bjorbaek, C. and B. B. Kahn (2004). "Leptin signaling in the central nervous system and the periphery." Recent Prog Horm Res 59: 305-331.

Bjorbaek, C., S. Uotani, B. da Silva and J. S. Flier (1997). "Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor." J Biol Chem 272(51): 32686-32695.

Bluher, S. and C. S. Mantzoros (2007). "Leptin in reproduction." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 14(6): 458-464.

Bricou, A., R. E. Batt and C. Chapron (2008). "Peritoneal fluid flow influences anatomical distribution of endometriotic lesions: why Sampson seems to be right." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 138(2): 127-134.

Bulletti, C., M. E. Coccia, S. Battistoni and A. Borini (2010). "Endometriosis and infertility." J Assist Reprod Genet 27(8): 441-447.

Bulun, S. E., K. Zeitoun, K. Takayama, L. Noble, D. Michael, E. Simpson, A. Johns, M. Putman and H. Sasano (1999). "Estrogen production in endometriosis and use of aromatase inhibitors to treat endometriosis." Endocr Relat Cancer 6(2): 293-301.

Bulun, S. E., K. M. Zeitoun, K. Takayama and H. Sasano (2000). "Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance." J Mol Endocrinol 25(1): 35-42.

Buyse, M., F. Berlioz, S. Guilmeau, A. Tsocas, T. Voisin, G. Peranzi, D. Merlin, M. Laburthe, M. J. Lewin, C. Roze and A. Bado (2001). "PepT1-mediated epithelial transport of dipeptides and cephalexin is enhanced by luminal leptin in the small intestine." J Clin Invest 108(10): 1483-1494.

Castracane, V. D., R. R. Kraemer, M. A. Franken, G. R. Kraemer and T. Gimpel (1998). "Serum leptin concentration in women: effect of age, obesity, and estrogen administration." Fertil Steril 70(3): 472-477.

Ceccaroni, M., G. Roviglione, P. Giampaolino, R. Clarizia, F. Bruni, G. Ruffo, T. S. Patrelli, G. De Placido and L. Minelli (2013). "Laparoscopic surgical treatment of diaphragmatic endometriosis: a 7-year single-institution retrospective review." Surg Endosc 27(2): 625-632.

Cheng, Y. M., S. T. Wang and C. Y. Chou (2002). "Serum CA-125 in preoperative patients at high risk for endometriosis." Obstet Gynecol 99(3): 375-380.

Cramer, D. W., E. Wilson, R. J. Stillman, M. J. Berger, S. Belisle, I. Schiff, B. Albrecht, M. Gibson, B. V. Stadel and S. C. Schoenbaum (1986). "The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise." JAMA 255(14): 1904-1908.

Cunningham, M. J., D. K. Clifton and R. A. Steiner (1999). "Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms." Biol Reprod 60(2): 216-222.

Darrow, S. L., J. E. Vena, R. E. Batt, M. A. Zielezny, A. M. Michalek and S. Selman (1993). "Menstrual cycle characteristics and the risk of endometriosis." Epidemiology 4(2): 135-142.

De Placido, G., C. Alviggi, C. Carravetta, M. L. Pisaturo, V. Sanna, M. Wilding, G. M. Lord and G. Matarese (2001). "The peritoneal fluid concentration of leptin is increased in women with peritoneal but not ovarian endometriosis." Hum Reprod 16(6): 1251-1254.

Donnez, J. and M. Nisolle (1994). "Endoscopic management of ectopic pregnancy." Baillieres Clin Obstet Gynaecol 8(4): 707-722.

Ebenbichler, C. F., S. Kaser, M. Laimer, H. J. Wolf, J. R. Patsch and N. P. Illsley (2002). "Polar expression and phosphorylation of human leptin receptor isoforms in paired, syncytial, microvillous and basal membranes from human term placenta." Placenta 23(6): 516-521.

Ferrero, S., P. Anserini, V. Remorgida and N. Ragni (2005). "Body mass index in endometriosis." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 121(1): 94-98.

Flier, J. S. (1998). "Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role." J Clin Endocrinol Metab 83(5): 1407-1413.

Fruhbeck, G. (2006). "Intracellular signalling pathways activated by leptin." Biochem J 393(Pt 1): 7-20.

Gao, X., Y. C. Yeh, J. Outley, J. Simon, M. Botteman and J. Spalding (2006). "Health-related quality of life burden of women with endometriosis: a literature review." Curr Med Res Opin 22(9): 1787-1797.

Giudice, L. C. (2010). "Clinical practice. Endometriosis." N Engl J Med 362(25): 2389-2398.

Goiot, H., S. Attoub, S. Kermorgant, J. P. Laigneau, B. Lardeux, T. Lehy, M. J. Lewin and A. Bado (2001). "Antral mucosa expresses functional leptin receptors coupled to STAT-3 signaling, which is involved in the control of gastric secretions in the rat." Gastroenterology 121(6): 1417-1427.

Gonzalez, R. R., C. Simon, P. Caballero-Campo, R. Norman, D. Chardonnens, L. Devoto and P. Bischof (2000). "Leptin and reproduction." Hum Reprod Update 6(3): 290-300.

Guerrero Hernandez, A., G. Oropeza Rechy and E. Gomez Garcia (2012). "[Risk factors associated, diagnostic methods and treatment for endometriosis, used in clinical service endometriosis gynecology Hospital General de Mexico (2009-2011)]." Ginecol Obstet Mex 80(10): 637-643.

Gungor, T., M. Kanat-Pektas, R. Karayalcin and L. Mollamahmutoglu (2009). "Peritoneal fluid and serum leptin concentrations in women with primary infertility." Arch Gynecol Obstet 279(3): 361-364.

Haffner, S. M., H. Miettinen, L. Mykkanen, P. Karhapaa, D. L. Rainwater and M. Laakso (1997). "Leptin concentrations and insulin sensitivity in normoglycemic men." Int J Obes Relat Metab Disord 21(5): 393-399.

Hardie, L., P. Trayhurn, D. Abramovich and P. Fowler (1997). "Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy." Clin Endocrinol (Oxf) 47(1): 101-106.

Hediger, M. L., H. J. Hartnett and G. M. Louis (2005). "Association of endometriosis with body size and figure." Fertil Steril 84(5): 1366-1374.

Hileman, S. M., D. D. Pierroz, H. Masuzaki, C. Bjorbaek, K. El-Haschimi, W. A. Banks and J. S. Flier (2002). "Characterizaton of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity." Endocrinology 143(3): 775-783.

Huang, H., C. Li, P. Zarogoulidis, K. Darwiche, N. Machairiotis, L. Yang, M. Simoff, E. Celis, T. Zhao, K. Zarogoulidis, N. Katsikogiannis, W. Hohenforst-Schmidt and Q. Li (2013). "Endometriosis of the lung: report of a case and literature review." Eur J Med Res 18: 13.

Janeckova, R. (2001). "The role of leptin in human physiology and pathophysiology." Physiol Res 50(5): 443-459.

Jeong, S. Y., D. J. Chung, D. Myung Yeo, Y. T. Lim, S. T. Hahn and J. M. Lee (2013). "The usefulness of computed tomographic colonography for evaluation of deep infiltrating endometriosis: comparison with magnetic resonance imaging." J Comput Assist Tomogr 37(5): 809-814.

Kao, L. C., A. Germeyer, S. Tulac, S. Lobo, J. P. Yang, R. N. Taylor, K. Osteen, B. A. Lessey and L. C. Giudice (2003). "Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility." Endocrinology 144(7): 2870-2881.

Karlsson, C., K. Lindell, E. Svensson, C. Bergh, P. Lind, H. Billig, L. M. Carlsson and B. Carlsson (1997). "Expression of functional leptin receptors in the human ovary." J Clin Endocrinol Metab 82(12): 4144-4148.

Kitawaki, J., H. Koshiba, H. Ishihara, I. Kusuki, K. Tsukamoto and H. Honjo (2000). "Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle." J Clin Endocrinol Metab 85(5): 1946-1950.

Koninckx, P. R., A. Ussia, L. Adamyan, A. Wattiez and J. Donnez (2012). "Deep endometriosis: definition, diagnosis, and treatment." Fertil Steril 98(3): 564-571.

La Cava, A., C. Alviggi and G. Matarese (2004). "Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity." J Mol Med (Berl) 82(1): 4-11.

Lago, F., C. Dieguez, J. Gomez-Reino and O. Gualillo (2007). "Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation." Nat Clin Pract Rheumatol 3(12): 716-724.

Lebovic, D. I., M. D. Mueller and R. N. Taylor (2001). "Immunobiology of endometriosis." Fertil Steril 75(1): 1-10.

Lee, G. H., R. Proenca, J. M. Montez, K. M. Carroll, J. G. Darvishzadeh, J. I. Lee and J. M. Friedman (1996). "Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice." Nature 379(6566): 632-635.

Licinio, J., A. B. Negrao, C. Mantzoros, V. Kaklamani, M. L. Wong, P. B. Bongiorno, A. Mulla, L. Cearnal, J. D. Veldhuis, J. S. Flier, S. M. McCann and P. W. Gold (1998). "Synchronicity of frequently sampled, 24-h concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone, and estradiol in healthy women." Proc Natl Acad Sci U S A 95(5): 2541-2546.

Lima-Couy, I., A. Cervero, F. Bonilla-Musoles, A. Pellicer and C. Simon (2004). "Endometrial leptin and leptin receptor expression in women with severe/moderate endometriosis." Mol Hum Reprod 10(11): 777-782.

Mahutte, N. G., I. M. Matalliotakis, A. G. Goumenou, S. Vassiliadis, G. E. Koumantakis and A. Arici (2003). "Inverse correlation between peritoneal fluid leptin concentrations and the extent of endometriosis." Hum Reprod 18(6): 1205-1209.

Margetic, S., C. Gazzola, G. G. Pegg and R. A. Hill (2002). "Leptin: a review of its peripheral actions and interactions." Int J Obes Relat Metab Disord 26(11): 1407-1433.

Marroqui, L., A. Gonzalez, P. Neco, E. Caballero-Garrido, E. Vieira, C. Ripoll, A. Nadal and I. Quesada (2012). "Role of leptin in the pancreatic beta-cell: effects and signaling pathways." J Mol Endocrinol 49(1): R9-17.

Masuzaki, H., Y. Ogawa, N. Sagawa, K. Hosoda, T. Matsumoto, H. Mise, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, I. Tanaka, T. Mori and K. Nakao (1997). "Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans." Nat Med 3(9): 1029-1033.

Matarese, G., C. Alviggi, V. Sanna, J. K. Howard, G. M. Lord, C. Carravetta, S. Fontana, R. I. Lechler, S. R. Bloom and G. De Placido (2000). "Increased leptin levels in serum and peritoneal fluid of patients with pelvic endometriosis." J Clin Endocrinol Metab 85(7): 2483-2487.

Matarese, G., G. De Placido, Y. Nikas and C. Alviggi (2003). "Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease?" Trends Mol Med 9(5): 223-228.

Messinis, I. E. and S. D. Milingos (1999). "Leptin in human reproduction." Hum Reprod Update 5(1): 52-63.

Missmer, S. A., S. E. Hankinson, D. Spiegelman, R. L. Barbieri, L. M. Marshall and D. J. Hunter (2004). "Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors." Am J Epidemiol 160(8): 784-796.

Monajemzadeh, M., M. T. Ashtiani, E. Sadrian, S. Shams, F. Motamed, M. N. Sani, S. S. Banihosseini and A. Abbasi (2013). "Variation in plasma leptin levels in young Iranian children with cystic fibrosis." Arch Med Sci 9(5): 883-887.

Moschos, S., J. L. Chan and C. S. Mantzoros (2002). "Leptin and reproduction: a review." Fertil Steril 77(3): 433-444.

Murakami, T., M. Iida and K. Shima (1995). "Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes." Biochem Biophys Res Commun 214(3): 1260-1267.

Myers, M. G., Jr. (2004). "Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology." Recent Prog Horm Res 59: 287-304.

Nacul, A. P., S. B. Lecke, M. I. Edelweiss, D. M. Morsch and P. M. Spritzer (2013). "Gene expression of leptin and long leptin receptor isoform in endometriosis: a case-control study." Obstet Gynecol Int 2013: 879618.

Nagle, C. M., T. A. Bell, D. M. Purdie, S. A. Treloar, C. M. Olsen, S. Grover and A. C. Green (2009). "Relative weight at ages 10 and 16 years and risk of endometriosis: a case-control analysis." Hum Reprod 24(6): 1501-1506.

Niswender, K. D., G. J. Morton, W. H. Stearns, C. J. Rhodes, M. G. Myers, Jr. and M. W. Schwartz (2001). "Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia." Nature 413(6858): 794-795.

Nitsch, B., C. S. Ho and J. Cullen (1988). "Barium study of small bowel endometriosis." Gastrointest Radiol 13(4): 361-363.

Ogawa, Y., H. Masuzaki, N. Isse, T. Okazaki, K. Mori, M. Shigemoto, N. Satoh, N. Tamura, K. Hosoda, Y. Yoshimasa and et al. (1995). "Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats." J Clin Invest 96(3): 1647-1652.

Oh, H. K., Y. S. Choi, Y. I. Yang, J. H. Kim, P. C. Leung and J. H. Choi (2013). "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 19(3): 160-168.

Otvos, L., Jr., M. Terrasi, S. Cascio, M. Cassone, G. Abbadessa, F. De Pascali, L. Scolaro, D. Knappe, M. Stawikowski, P. Cudic, J. D. Wade, R. Hoffmann and E. Surmacz (2008). "Development of a pharmacologically improved peptide agonist of the leptin receptor." Biochim Biophys Acta 1783(10): 1745-1754.

Ozkan, S., W. Murk and A. Arici (2008). "Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments." Ann N Y Acad Sci 1127: 92-100.

Parazzini, F., F. Chiaffarino, M. Surace, L. Chatenoud, S. Cipriani, V. Chiantera, G. Benzi and L. Fedele (2004). "Selected food intake and risk of endometriosis." Hum Reprod 19(8): 1755-1759.

“Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996.” (1997) Fertil Steril 67(5): 817-821.

Ribeiro, S. M. L., Z. A. d. Santos, R. J. d. Silva, E. Louzada, J. Donato Junior and J. Tirapegui (2007). "Leptina: aspectos sobre o balanço energético, exercício físico e amenorréia do esforço." Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia 51: 11-24.

Rogers, P. A., T. M. D'Hooghe, A. Fazleabas, C. E. Gargett, L. C. Giudice, G. W. Montgomery, L. Rombauts, L. A. Salamonsen and K. T. Zondervan (2009). "Priorities for endometriosis research: recommendations from an international consensus workshop." Reprod Sci 16(4): 335-346.

Rosenbaum, M., M. Nicolson, J. Hirsch, S. B. Heymsfield, D. Gallagher, F. Chu and R. L. Leibel (1996). "Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin." J Clin Endocrinol Metab 81(9): 3424-3427.

Ryan, I. P., J. F. Tseng, E. D. Schriock, O. Khorram, D. V. Landers and R. N. Taylor (1995). "Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis." Fertil Steril 63(4): 929-932.

Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, Jr., R. J. Seeley and D. G. Baskin (2000). "Central nervous system control of food intake." Nature 404(6778): 661-671.

Shah, D. K., K. F. Correia, A. F. Vitonis and S. A. Missmer (2013). "Body size and endometriosis: results from 20 years of follow-up within the Nurses' Health Study II prospective cohort." Hum Reprod 28(7): 1783-1792.

Shimizu, H., Y. Shimomura, Y. Nakanishi, T. Futawatari, K. Ohtani, N. Sato and M. Mori (1997). "Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects." J Endocrinol 154(2): 285-292.

Signorello, L. B., B. L. Harlow, D. W. Cramer, D. Spiegelman and J. A. Hill (1997). "Epidemiologic determinants of endometriosis: a hospital-based case-control study." Ann Epidemiol 7(4): 267-741.

Simpson, E. R., M. S. Mahendroo, G. D. Means, M. W. Kilgore, M. M. Hinshelwood, S. Graham-Lorence, B. Amarneh, Y. Ito, C. R. Fisher, M. D. Michael and et al. (1994). "Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis." Endocr Rev 15(3): 342-355.

Slieker, L. J., K. W. Sloop, P. L. Surface, A. Kriauciunas, F. LaQuier, J. Manetta, J. Bue-Valleskey and T. W. Stephens (1996). "Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP." J Biol Chem 271(10): 5301-5304.

Suganami, E., H. Takagi, H. Ohashi, K. Suzuma, I. Suzuma, H. Oh, D. Watanabe, T. Ojima, T. Suganami, Y. Fujio, K. Nakao, Y. Ogawa and N. Yoshimura (2004). "Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells." Diabetes 53(9): 2443-2448.

Sweeney, G. (2002). "Leptin signalling." Cell Signal 14(8): 655-663.

Szubert, M., J. Suzin, T. Wierzbowski and K. Kowalczyk-Amico (2012). "CA-125 concentration in serum and peritoneal fluid in patients with endometriosis - preliminary results." Arch Med Sci 8(3): 504-508.

Tao, Y., Q. Zhang, W. Huang, H. Zhu, D. Zhang and W. Luo (2011). "The peritoneal leptin, MCP-1 and TNF-alpha in the pathogenesis of endometriosis-associated infertility." Am J Reprod Immunol 65(4): 403-406.

Tartaglia, L. A. (1997). "The leptin receptor." J Biol Chem 272(10): 6093-6096.

Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K. J. Moore, J. S. Smutko, G. G. Mays, E. A. Wool, C. A. Monroe and R. I. Tepper (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." Cell 83(7): 1263-1271.

Tataranni, P. A., M. B. Monroe, C. A. Dueck, S. A. Traub, M. Nicolson, M. M. Manore, K. S. Matt and E. Ravussin (1997). "Adiposity, plasma leptin concentration and reproductive function in active and sedentary females." Int J Obes Relat Metab Disord 21(9): 818-821.

Teirmaa, T., V. Luukkaa, J. Rouru, M. Koulu and R. Huupponen (1998). "Correlation between circulating leptin and luteinizing hormone during the menstrual cycle in normal-weight women." Eur J Endocrinol 139(2): 190-194.

Venner, A. A., M. E. Lyon and P. K. Doyle-Baker (2006). "Leptin: a potential biomarker for childhood obesity?" Clin Biochem 39(11): 1047-1056.

Vercellini, P., L. Fedele, G. Aimi, G. Pietropaolo, D. Consonni and P. G. Crosignani (2007). "Association between endometriosis stage, lesion type, patient characteristics and severity of pelvic pain symptoms: a multivariate analysis of over 1000 patients." Hum Reprod 22(1): 266-271.

Vigano, P., F. Parazzini, E. Somigliana and P. Vercellini (2004). "Endometriosis: epidemiology and aetiological factors." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 18(2): 177-200.

Vigano, P., E. Somigliana, R. Matrone, A. Dubini, C. Barron, M. Vignali and A. M. di Blasio (2002). "Serum leptin concentrations in endometriosis." J Clin Endocrinol Metab 87(3): 1085-1087.

Wang, M. Y., Y. T. Zhou, C. B. Newgard and R. H. Unger (1996). "A novel leptin receptor isoform in rat." FEBS Lett 392(2): 87-90.

Wertel, I., M. Gogacz, G. Polak, J. Jakowicki and J. Kotarski (2005). "Leptin is not involved in the pathophysiology of endometriosis-related infertility." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 119(2): 206-209.

Wu, M. H., K. F. Chen, S. C. Lin, C. W. Lgu and S. J. Tsai (2007). "Aberrant expression of leptin in human endometriotic stromal cells is induced by elevated levels of hypoxia inducible factor-1alpha." Am J Pathol 170(2): 590-598.

Wu, M. H., P. C. Chuang, H. M. Chen, C. C. Lin and S. J. Tsai (2002). "Increased leptin expression in endometriosis cells is associated with endometrial stromal cell proliferation and leptin gene up-regulation." Mol Hum Reprod 8(5): 456-464.

Wu, M. H., M. F. Huang, F. M. Chang and S. J. Tsai (2010). "Leptin on peritoneal macrophages of patients with endometriosis." Am J Reprod Immunol 63(3): 214-221.

Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature 372(6505): 425-432.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PEDRO ERNESTO/
UNIVERSIDADE DO ESTADO

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 explca bem e linguagem leiga sobre a Bx de ovário e as condutas em relação aos achados histopatológicos.

Recomendações:

Nenhuma

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PEDRO ERNESTO/
UNIVERSIDADE DO ESTADO

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. Sª., 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)

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Universidade do Estado do Rio de Janeiro, em colaboração com o Hospital Universitário Pedro Ernesto, está desenvolvendo uma pesquisa científica que permitirá conhecer melhor alterações genéticas associadas ao quadro clínico de pacientes com a doença endometriose. Este estudo é realizado utilizando uma pequena quantidade de sangue e/ou amostra de tecido do trato genital afetado pela enfermidade. A amostra será identificada no laboratório por um código formado por números e/ou letras, preservando integralmente a privacidade e identidade da doadora. A eventual inclusão dos resultados em publicações científicas será feita de modo a garantir o anonimato da mesma.

É necessário esclarecer ainda a doadora, que não existem benefícios ou direitos financeiros a receber sob os eventuais resultados decorrentes da pesquisa, bem como da própria amostra fornecida, sendo assim, a doação de caráter totalmente voluntário. Em caso de discordância na doação do material, tal decisão não influenciará, de nenhum modo, no atendimento ou tratamento da paciente neste hospital. Em caso de dúvidas sobre este documento ou com relação à pesquisa, por gentileza, entrar em contato com a Profa. Dra. Cristiane da Fonte Ramos, no telefone (21) 28688386.

Uma cópia deste documento será arquivada em prontuário e, caso haja necessidade, outra será fornecida a doadora.

Declaro estar ciente das informações prestadas, tendo lido atentamente e concordado com o teor deste documento, autorizando a utilização de minha(s) amostra(s) biológica(s) para os devidos fins.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 20__.

_____

Assinatura do Paciente ou Responsável

Nome: _____

RG: _____ CPF: _____

_____ _____

Assinatura do pesquisador Assinatura do orientador

ANEXO C – ARTIGO CIENTÍFICO

Gonçalves et al. Journal of Ovarian Research (2015) 8:53
DOI 10.1186/s13048-015-0180-0

JOURNAL OF OVARIAN RESEARCH

RESEARCH Open Access

Leptin, its receptor and aromatase expression in deep infiltrating endometriosis

Helder F. Gonçalves[1*], Carolina Zendron[2], Fernanda S. Cavalcante[1], Verônica Aiceles[1], Marco Aurélio P. Oliveira[2], Jorge Henrique M. Manaia[3], Márcio A. Babinski[3] and Cristiane F. Ramos[1]

Abstract

Background: The aim of this study was to evaluate the leptin levels in the serum and peritoneal fluid (PF) and the protein expression in three different peritoneal ectopic implants in patients who underwent surgery for deep infiltrating endometriosis.

Methods: All patients had been treated at the Department of Gynecology of the Pedro Ernesto University Hospital, Rio de Janeiro. The study group consisted of 15 patients who underwent surgery for adnexal masses and infertility, while the control group consisted of ten women who underwent surgery for tubal ligation. Peritoneal fluid and samples tissues were collected during surgery. Serum samples were obtained before anesthesia. In this study, the leptin levels in the serum and peritoneal fluid (PF) were evaluated by ELISA. The protein expression of leptin and its receptors (ObR) and aromatase enzyme were evaluated by Western blot analysis of the intestine, uterosacral ligament and vaginal septum in the ectopic implants. The *t*-test and one-way ANOVA with Holm-Sidak post-test were used, and $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results: Compared to the controls, the serum leptin levels (control = 14.7 ng/mL ± 2.63, endometriosis = 19.2 ng/mL ± 1.84, $p < 0.0001$) were increased, while in PF, there was no difference (control = 6.68 ng/mL ± 0.43, endometriosis = 7.71 ng/mL ± 0.59, $p = 0.18$). Comparing women with and without ovarian implants, the leptin levels in both the serum and PF were significantly higher in women without ovarian implants (serum: with ovarian implant = 15.85 ± 1.99; without ovarian implant = 23.14 ± 2.60; ng/mL, $p = 0.04$; PF: with ovarian implant = 4.28 ± 1.30; without ovarian implant = 11.18 ± 2.98;ng/mL, $p = 0.048$). The leptin, ObR and aromatase protein expression levels were increased in lesions in the vaginal septum and were decreased in the intestine lesions.

Conclusion: This study reports several interesting associations between the leptin levels in serum, peritoneal fluid, and tissue samples and the localization of the ectopic endometrium. Although this study does not provide a clear picture of the role of leptin in the development and progression of peritoneal implants, it contributed new data that might be useful to elucidating the enigma that is the role of leptin in endometriosis disease.

Keywords: Endometrial implants, Endometriosis, Peritoneal fluid, Leptin, Leptin receptor, Aromatase

Background

Endometriosis is a chronic, estrogen-dependent inflammatory disease characterized by implantation and growth of tissue outside of the uterus in lesions of varying sizes and appearance containing endometrial glands and stroma associated, or not, with infertility, dysmenorrhea, and pelvic pain [1–3]. This disease represents a public health issue affecting 10–15 % of women of reproductive age [4]. Studies have demonstrated that endometriosis is associated with the increased secretion of pro-inflammatory cytokines and growth as well as angiogenic factors [5].

Leptin, the 16 kDa product of the Obese (Ob) gene, is predominantly produced in adipose tissue [6]. This hormone is known for its role in food intake, basal metabolism, and reproductive function [7]. Leptin is now recognized to have immune-regulatory, pro-inflammatory, and neoangiogenesis functions, and it is thought to have a role in the pathogenesis of endometriosis [5, 8–12].

* Correspondence: goncalves.hf@gmail.com
[1]Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Center, Institute of Biology, Department of Anatomy, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2015 Gonçalves et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.