

PAULO D'AMORA

**EFEITO DA PROGESTERONA NO CICLO CELULAR DE CÉLULAS
ENDOMETRIAIS DE MULHERES COM ENDOMETRIOSE PÉLVICA
PORTADORAS DO POLIMORFISMO PROGINS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola
Paulista de Medicina para obtenção
do Título de Doutor em Ciências

SÃO PAULO

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PAULO D'AMORA

**EFEITO DA PROGESTERONA NO CICLO CELULAR DE CÉLULAS
ENDOMETRIAIS DE MULHERES COM ENDOMETRIOSE PÉLVICA
PORTADORAS DO POLIMORFISMO PROGINS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola
Paulista de Medicina para obtenção
do Título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Schor

Co-orientador: Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva
Dr. Thiago Trovati Maciel

SÃO PAULO

2009

D'Amora, Paulo

EFEITO DA PROGESTERONA NO CICLO CELULAR DE CÉLULAS ENDOMETRIAIS DE MULHERES COM ENDOMETRIOSE PÉLVICA PORTADORAS DO POLIMORFISMO PROGINS. Paulo D'Amora. --São Paulo, 2009.

xxix, 44f.

Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher (Ginecologia).

Título em inglês: Progesterone Effect on the Cell Cycle Control in Endometrial Cells from Women with Endometriosis Harboring the PROGINS Polymorphism.

1. Endometriose 2. Receptor da Progesterona 3. Polimorfismo PROGINS.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA

Chefe do Departamento de Ginecologia

Prof. Dr. Afonso Celso Pinto Nazário

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

SÃO PAULO

2009

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE DA BANCA

Prof. Dr. Eduardo Schor

Professor Afiliado do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina – UNIFESP-EPM.

TITULARES

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

Professor Associado do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina – UNIFESP-EPM.

Prof. Dr. Tsutomu Aoki

Professor Adjunto e Diretor do Serviço de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo - FCMSCSP.

Prof. Dr. Paulo Ayrosa Ribeiro Galvão

Professor Assistente do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo - FCMSCSP.

Prof. Dr. Luís Garcia Alonso

Professor Adjunto do Departamento de Morfologia e Genética da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina - UNIFESP-EPM.

SUPLENTE

Prof. Dr. Eduardo Lemos Alves da Motta

Professor Adjunto do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina - UNIFESP-EPM.

Prof. Dr. Péricles Assad Hassun Filho

Doutor em Endocrinologia Molecular pela Disciplina de Endocrinologia Clínica do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina - UNIFESP-EPM.

*"I know not how I may seem to others, but to myself I am but a small child
wandering upon the vast shores of knowledge, every now and then finding a
small bright pebble to content myself with."*

Douglas K. Silbee

Agradeço a **DEUS**,
Acima de tudo e de todas as coisas.

À minha noiva **Márcia**, minha incansável companheira de todas as horas, pelos quase 5 anos de muito AMOR, companheirismo e paciência.

Dedico este trabalho à minha mãe, **Célia Elisabete D'Amora**, na certeza que seu coração está repleto de alegria e orgulho.

Ao meu pai, **Biaggio D'Amora Filho** (*in memoriam*). Que um dia sonhou e hoje, com certeza, compartilha esse momento comigo.
A saudade é grande...

Aos meus irmãos, **Pri** e **Bruno** e minha avó **Beth**, pela maneira com que me apoiaram e compreenderam meus momentos de ausência durante minha formação.

Aos meus sogros, **Felício** e **Dona Deise**, meu cunhado **Leandro**, minha mais nova avó, **Dona Isaura**, por me acolherem por tantos anos com tanto carinho.

Aos meus Orientadores,

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva,

Pela maneira simples e amigável com que, durante esses quase 7 anos, me apoiou, me ensinou e me guiou para uma Formação Humana, Científica e agora Médica.

Prof. Dr. Eduardo Schor,

Sempre presente, pelo seu interesse científico e abertura a novas idéias, forte incentivo, apoio e carinho a este trabalho.

Dr. Thiago Trovati Maciel,

Este trabalho não seria possível sem o teu seu apoio e orientação.

Dedico esta tese a você, meu AMIGO!!

Aos meus IRMÃOS de sangue,

A todos os colegas da 33ª turma de Acadêmicos do Curso de Ciências Biológicas – Modalidade Médica, da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-UNIFESP).

À querida “Ala B”

Chester, Leandro, Iuri, Marcelo, Rodrigo, Samuca e Thiago.

Saudades daquele tempo!!!

Aos meus mais novos AMIGOS,

A todos os colegas da 74ª turma de Acadêmicos do Curso de Medicina, da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-UNIFESP).

Sem dúvida, a MELHOR turma de Medicina da EPM!

Especialmente para os amigos da Turma G do 4º Ano,

O “Burrote 74”

Anderson (Ander), Artur, Diego (Dieguito “São Luis”!), Elton, Enzo, Gabriel (Gabera!), Guilherme (Brickola!), Fábio, Felipe (Goiano!), Fernando (Moita), Marlon (Toy), Rodrigo (Prof. Rodiney), Tiago (Pimp), Umberto (Umbertinho), Vinícius (Zina).

À
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA da Universidade Federal de
São Paulo.

Minha vida!

Novamente aos meus grandes orientadores, Profs. Drs. Eduardo Schor e Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva, do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM, e Dr. Thiago T. Maciel da Disciplina de Nefrologia da UNIFESP-EPM, por toda a liberdade, confiança, apoio e incentivo durante minha vida acadêmica. Com certeza, se não tivesse tido vocês como orientadores tudo seria muito mais difícil.

Ao Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão, Professor Titular do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM, por todo apoio, incentivo e consideração desde o início de minha Pós-Graduação e também por ter sido meu Tutor no Programa MD/PhD da UNIFESP-EPM.

À Profa. Catarina Porto, Profa. Livre Docente da Disciplina de Farmacologia Endócrina do Departamento de Farmacologia da UNIFESP-EPM, pelas primeiras discussões técnicas sobre a viabilidade do trabalho.

Aos amigos mais novos e mais antigos do Laboratório de Ginecologia Molecular... Um agradecimento àqueles com quem estive durante os meus 6 anos de Pós-Graduação no Laboratório do Prof. Ismael: Ana Maria Taborda, Amanda, Audrey, Beatriz Schnabel, Cíntia e Eduardo Macoto, Dani Leite, Dani Vidotti, Elenir, Erika, Fabiola, Gabriela, Giannina, Giovana Gonçalves, Jéssica, João Paulo Kleine, Julinha, Dr. Juvenal, Marcinho, Maria Carolina (Carô), Mariana Leão, Michele Junqueira, Michelle Zampieri, Naiara, Dr. Péricles, Regina Affonso, Dr. Ricardo e

Dra Priscila, Samuel (Samuca!) e Silvana, Tatiana Batista Penna dos Santos, Tati Bonetti, pela inestimável convivência. Sempre seremos alunos do Prof. Ismael!!!

Um agradecimento especial à Profa. Dra. Cristina Valleta de Carvalho, minha amiga, por ter sido a primeira pessoa a me receber no Laboratório do Prof. Ismael e por ter me orientado em meus primeiros passos no intrigante, porém fascinante, mundo da Biologia Molecular.

Aos membros do Setor de Algia Pélvica e Endometriose do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM. À equipe clínico-cirúrgica Drs. Alexander Kopelman, Ederlei M. Pinsuti, Marcos V.C. Menezes, Raphael G.M. Leão. A todos da equipe de fisioterapeutas, Dras. Titiana Maria Trípoli, Renata Miranda, Liris L. Wuo e Christine Plöger.

Agradecimento especial ao Dr. Hélio Sato, pela ajuda, dos primeiros passos até aqui, mas principalmente pela amizade!

Às auxiliares de enfermagem do Setor de Algia Pélvica e Endometriose, Dona Ângela, Suely, Fátima pelo exemplo de profissionalismo, competência e humanismo.

Agradecimento especial para a amiga Dra. Eny F. Apollaro, pela amizade. Saudades de quando tudo começou!

Aos funcionários do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM, Karim Martins dos Santos, Zélia Maria Gomes Macedo, Valéria Miranda dos Santos Medina, Cecília, Felipe de Oliveira Taborda, pelo apoio e atenção durante toda minha Pós-Graduação no Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM.

A todos os Professores do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM. Uma homenagem especial ao Professor Claudio Kemp (*in memoriam*), pela honra de ter participado de trabalhos em seu grupo de pesquisa, pela consideração e amizade apesar do pouco tempo de convivência.

Aos Prof. Drs. Nestor Schor, Alexandre Holthausen Campos e novamente ao Dr. Thiago Trovati Maciel (meu colega de turma, grande amigo e co-orientador), por todos os ensinamentos, pelo apoio técnico, logístico e material que recebemos desde o início do projeto no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Disciplina de Nefrologia, dando-nos todo o suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho. Agradecemos imensamente toda a colaboração dos pós-graduandos, técnicos e demais funcionários da Disciplina de Nefrologia.

Ao Prof. Dr. João Bosco Pesquero e ao Dr. Marcelo Alves da Silva Mori (também colega de turma e amigo do peito!) que contribuíram muito para o desenvolvimento deste projeto com idéias e muito apoio técnico e material, principalmente a partir do segundo ano, após a reforma ocorrida no Laboratório Cultura de Células da Disciplina de Nefrologia quando passamos a utilizar o *Facility* de Cultura de Células do Departamento de Biofísica. Agradecimento

especial ao amigo Ivan H. Cordeiro, responsável pelo Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Biofísica por todo o apoio técnico durante a finalização dos experimentos, mas principalmente pela amizade.

To Dr. Andrea Romano, for all his wise advices and concerns regarding the PROGINS polymorphism. Thanks for helping us continue this work.

A Marcelo Anéas, na época, especialista em produtos da G&E Healthcare, pelo auxílio técnico e análise dos dados gerados em citometria de fluxo.

À Profa. Janete Maria Cerutti e suas alunas Flávia, Gisele, Mariana, Sharmila e Beatriz pela ajuda na finalização dos meus experimentos em citometria de fluxo.

À Profa. Dra. Mari C. Sogayar e sua aluna Rita de Cássia S. Figueira, do Instituto de Química da USP, pelo auxílio com os experimentos finais em PCR quantitativo, que foram solicitados pelo revisor da *American Journal of Pathology*.

Aos amigos Drs. Fabio Glinternick Bitelli e Antonio H. de Freias Junior da *Neomater Hospital e Maternidade e Hospital e Maternidade Dr. Christovão da Gama*, respectivamente, pela inestimável ajuda e pela agradável convivência durante a realização deste trabalho.

À *Word Endometriosis Society (WES)* pelo Prêmio de Melhor Trabalho Científico concedido no “10th World Congress on Endometriosis”.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro necessário para execução deste trabalho (processo no. 04/09810-6).

Ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro através da concessão de minha bolsa de doutorado (processo no. 130538/2006-3) e pelo custeio dos encargos relativos à publicação de nosso artigo científico.

APRESENTAÇÃO.....	xxiv
RESUMO.....	xxviii
INTRODUÇÃO.....	1
PROPOSIÇÃO.....	5
ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY</i>	6
DISCUSSÃO.....	17
CONCLUSÕES.....	20
BIBLIOGRAFIA DA APRESENTAÇÃO, INTRODUÇÃO E DISCUSSÃO.....	21
ANEXOS.....	27

Nesta tese de doutorado, realizada com apoio da FAPESP (projeto temático 03/04533-1 e projeto de auxílio regular 04/09810-6) e da CAPES (concessão de bolsa de doutorado), intitulada “*EFEITO DA PROGESTERONA NO CICLO CELULAR DE CÉLULAS ENDOMETRIAIS DE MULHERES COM ENDOMETRIOSE PÉLVICA PORTADORAS DO POLIMORFISMO PROGINS*” apresentamos, de acordo com as recomendações constantes na ata da reunião do Conselho de Pós-Graduação da UNIFESP, realizada em 30/11/2005, e da Comissão Especial do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher (CEPG) do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), o trabalho publicado na revista *American Journal of Pathology*, fator de impacto: 5.917 (JCR 2006 - impact factor index), conforme descrito abaixo:

1. Paulo D'Amora, Thiago T. Maciel, Rodrigo Tambellini, Marcelo A. Mori, João Bosco Pesquero, Hélio Sato, Manoel J.B.C. Girão, Ismael D.C.G. Silva and Eduardo Schor. ***Disrupted Cell Cycle Control in Cultured Endometrial Cells from Patients with Endometriosis Harboring the Progesterone Receptor Polymorphism PROGINS.*** *Am J Pathol* 2009;175(1):215-224.

Este estudo foi desenvolvido no Setor de Algia Pélvica e Endometriose e no Laboratório de Ginecologia Molecular e Proteômica do Departamento de Ginecologia (UNIFESP-EPM), em colaboração com os Laboratórios de Biologia Celular e Molecular da Disciplina de Nefrologia do Departamento de Medicina (UNIFESP-EPM), Laboratório de Cultura de Células do Departamento de

Biofísica (UNIFESP-EPM) e Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (IEP-HIAE).

O interesse na investigação dos aspectos da etiopatogenia da endometriose relacionados à resistência do endométrio iniciou-se após estudos desenvolvidos, em nosso serviço, que evidenciaram, neste tecido, alterações pertinentes ao ciclo celular. Com o avanço do conhecimento e a descoberta de outras alterações na mucosa uterina, a hipótese de que o endométrio de mulheres com endometriose possuía, de alguma forma, resistência à progesterona, ganhou corpo. Concomitante a estes estudos, em nosso laboratório, estava em andamento o Projeto Temático FAPESP 03/04533-1, coordenado pelo Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva, intitulado: *“Estudo de Polimorfismos em Genes Responsáveis pela Biossíntese, Ação e Metabolização de Esteróides Sexuais em Afecções Ginecológicas Estrogênio Dependentes e no Climatério”*.

Um dos diversos subprojetos desse estudo foi o trabalho de tese da Dra. Cristina Valleta de Carvalho que estudou os polimorfismos CYP17 e PROGINS em pacientes com endometriose pélvica. Os resultados desse estudo mostraram prevalência aumentada do polimorfismo PROGINS em mulheres com endometriose em comparação ao grupo controle, gerando um risco duas vezes maior para o desenvolvimento da endometriose em pacientes com pelo menos um alelo PROGINS ($p = 0,05$). Estes dados corroboraram resultados de dois outros importantes estudos realizados na Áustria por Wieser *et al.* (2002) e na Itália por Lattuada *et al.* (2004), os autores destes estudos encontraram associação significativa entre a presença do alelo PROGINS e a endometriose ($p = 0,004$ e $p = 0,041$, respectivamente) [1-3].

Além disso, quando consideramos algumas doenças ginecológicas estrogênio-dependente, nossos achados em relação ao polimorfismo PROGINS corroboram os encontrados por Pijnenborg *et al.* (2005) que demonstraram correlação entre o polimorfismo PROGINS e o risco para desenvolvimento de neoplasia endometrial [4,5]. O polimorfismo PROGINS também se mostrou prevalente em pacientes com câncer de ovário em estudo recentemente publicado por nosso grupo de pesquisas [6]. Considerando o câncer de mama, outra entidade estrogênio-dependente, DeVivo *et al.* (2003) encontraram significativa associação do risco para o desenvolvimento de câncer de mama em mulheres com a inserção PROGINS [7].

Frente aos nossos achados que mostram que o polimorfismo PROGINS é mais prevalente em mulheres com endometriose, procuramos estudar, do ponto de vista de associação causal, a repercussão variante PROGINS do receptor da progesterona, sob diversos aspectos do ciclo celular de células endometriais, em cultivo, de mulheres com endometriose, genotipadas para o polimorfismo PROGINS.

O referido estudo recebeu financiamento da FAPESP (projeto regular 04/09810-6), intitulado “*Avaliação do Estradiol e da Progesterona no Ciclo Celular de Células Endometriais, em Cultura, de Mulheres com Endometriose Pélvica, com e sem o Polimorfismo PROGINS no Gene do Receptor da Progesterona*”, coordenado pelo Prof. Dr. Eduardo Schor.

Neste trabalho, os experimentos visaram à análise de diversos parâmetros relacionados à biologia da célula endometrial como: controle do ciclo celular, proliferação celular, viabilidade celular, apoptose e expressão dos

receptores da progesterona, em culturas de células endometriais de pacientes com e sem endometriose, portadoras do polimorfismo PROGINS.

Alterações no endométrio vêm sendo implicadas na etiopatogenia da endometriose. Dentre os diversos distúrbios já identificados na mucosa uterina destacam-se os regulados pela progesterona, o que implica, de alguma forma, que uma resistência do endométrio ao hormônio pode estar envolvida na gênese da doença. O efeito da progesterona é regulado principalmente por duas isoformas de seu receptor (PRA e PRB) e uma alteração genética (polimorfismo), denominada PROGINS, no gene que codifica este receptor, leva ao desbalanço na expressão dessas subunidades, acarretando alterações fenotípicas já detectadas em enfermidades hormônio-dependentes. Em trabalho anterior, realizado em nosso laboratório, identificamos que, mulheres com esta alteração, tem cerca de duas vezes mais chances de desenvolver endometriose. Frente aos dados de que alterações endometriais estão envolvidas na etiopatogenia da endometriose, de que estas alterações são decorrentes da resistência deste tecido a ação da progesterona e de que o polimorfismo PROGINS, prevalente em mulheres com a doença possa estar relacionado à causa desta resistência, nos propusemos, no presente estudo, a avaliar alterações no ciclo celular de células endometriais em cultivo (genotipadas para o polimorfismo PROGINS), de mulheres com e sem endometriose, após tratamentos com estradiol e progesterona. Para tanto foi obtido tecido endometrial das pacientes durante cirurgia videolaparoscópica. Após a cirurgia as pacientes foram divididas, segundo o achado cirúrgico e de acordo com a detecção do polimorfismo PROGINS, em três grupos: pacientes com endometriose, com e sem o polimorfismo PROGINS (E+Alu e E-Alu) e outro formado por mulheres nas quais não foram evidenciadas alterações pélvicas, não portadoras do referido polimorfismo (CP-Alu). Este tecido foi

processado para cultura celular e subseqüentemente analisado no que se refere à funcionalidade do receptor de progesterona relacionada aos processos de proliferação celular, apoptose e progressão no ciclo celular. Nossos resultados mostraram que as células de pacientes com endometriose apresentaram diminuição da resposta à progesterona, com conseqüente aumento na proliferação celular com progressão descontrolada do ciclo celular, viabilidade celular sustentada e diminuição da taxa de morte celular por apoptose, especialmente no grupo de portadoras do polimorfismo PROGINS, em comparação ao grupo de não portadoras e grupo controle. Devido à importância da ação da progesterona no endométrio de pacientes com endometriose, nosso estudo apresenta evidências de que o polimorfismo PROGINS possa estar relacionado com a patogênese da endometriose.

Endometriose é uma doença crônica inflamatória de etiologia multifatorial caracterizada pela implantação e desenvolvimento de tecido endometrial (glândula e/ou estroma) fora do útero [8].

Moléstia que afeta 10%-15% de mulheres em idade reprodutiva, representa a segunda maior causa de histerectomias nos EUA e está associada à diminuição importante da qualidade de vida das portadoras [9,10]. A incidência da doença, bem como sua agressividade, vem crescendo, tornando a afecção um problema de saúde pública [11]. Sua prevalência em mulheres inférteis gira em torno de 60%; estando presente em 50% dos casos em adolescentes com dismenorréia grave (intratável) e 4% em mulheres assintomáticas submetidas à cirurgia para ligadura tubária [12,13].

O tratamento da endometriose pode ser cirúrgico, clínico ou a combinação de ambos. Apesar dos inúmeros esforços, a moléstia talvez tenha sido a doença ginecológica mais estudada na última década, cerca de 5000 publicações foram indexadas nos últimos dez anos, a abordagem terapêutica ainda deixa a desejar, independente da modalidade escolhida. Ao redor de 50% das pacientes vão apresentar recidiva da doença em cinco anos após o tratamento inicial [14]. O insucesso terapêutico se deve, provavelmente, ao pouco conhecimento sobre a etiopatogenia da doença, já que atualmente pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na gênese da endometriose.

Os possíveis mecanismos patogênicos incluem: (i) metaplasia das células mesoteliais da pleura e do peritônio em células endometriais epiteliais [16,17]; (ii) menstruação retrógrada com subsequente implantação de tecido endometrial na superfície peritoneal, proposta por Sampson, em 1925 [18]. (iii)

transporte do endométrio por via linfática e embolização vascular para sítios distantes da cavidade peritoneal, por exemplo, pele, pulmões, rins [19]. A hipótese proposta por Sampson, em 1925, foi a única comprovada cientificamente e, portanto, utilizada, durante quase a totalidade do século passado, para explicar a grande maioria dos casos da doença. Entretanto, no início da década de 80 do século passado, alguns autores descreveram a menstruação retrógrada em, cerca de, 80% das mulheres no menacma [20,21]. O regurgitamento tubáreo passou então, a ser encarado como um fenômeno fisiológico, não podendo, por si só, explicar a gênese da moléstia. Partindo deste pressuposto novas linhas de pesquisa foram desenvolvidas visando explicar a razão de apenas uma parcela das mulheres com menstruação retrógrada desenvolver a doença. Dentre elas podemos mencionar as que estudam (iv): fatores genéticos [22], hormonais [23], imunológicos [24], anatômicos [25] bem como ambientais [26]. Salienciamos a vertente que imputa a alterações no endométrio a origem da endometriose.

Várias alterações no endométrio eutópico de mulheres com endometriose em comparação ao tecido de mulheres sem a doença já foram descritas. Distúrbios no controle do ciclo celular, como aumento da proliferação ou diminuição da apoptose já foram relatados [26]. Da mesma forma, aumento da capacidade de adesão celular e de expressão de proteinases de matriz extracelular e de fatores angiogênicos são características demonstradas na mucosa uterina de mulheres enfermas [27].

Todos os fatores anteriormente citados, necessários para que haja o desenvolvimento da endometriose, foram demonstrados como sendo, de alguma forma, regulados pela progesterona, o que nos leva a crer que uma

alteração na função deste hormônio no endométrio possa levar ao desequilíbrio deste tecido e conseqüentemente predispor a doença [28-31].

Progesterona e o estradiol são importantes reguladores dos processos de proliferação e diferenciação celular no trato genital feminino. Alterações da resposta destes hormônios podem estar relacionadas ao aparecimento de doenças estrogênio-dependentes como a endometriose, câncer de endométrio, infertilidade, câncer de mama e ovário [32].

As principais ações da progesterona são mediadas por duas isoformas do receptor da progesterona (PRA e PRB), que são fatores de transcrição dependentes do ligante. A subunidade PRB difere da PRA pela existência de um resíduo adicional de 164 aminoácidos na porção N-terminal. A porção comum das subunidades é idêntica e é composta por uma região de ligação ao DNA o “*DNA-binding domain (DBD)*” e a região C-terminal que contém o domínio de ligação ao hormônio o “*ligand-binding domain (LDB)*”. A região *hinge* está presente entre os domínios DBD e LDB e está relacionada ao processo de translocação nuclear, dimerização e ligação à co-fatores, porém o entendimento completo de sua função ainda se faz necessário. Após a ligação com o hormônio e a formação de hetero- ou homo- dímeros, as subunidades PRA e PRB se ligam a elementos responsivos à progesterona (PRE) localizados na região promotora de genes alvo, modulando assim, sua expressão [33,34]. Estudos em linhagens celulares e em modelos animais demonstraram que as isoformas PRA e PRB possuem funções distintas [35-38].

Ambos os receptores são codificados por um único gene (PR), presente na região 11q22-23 do braço longo do cromossomo 11, é composto por 8

exons e 7 introns (A-G). A variante polimórfica do receptor PR denominada PROGINS consiste em uma inserção Alu de 320 pares de base PV/HS-1 no intron G e duas substituições pontuais de nucleotídeos (SNPs) [39-40]. A substituição SNP-G3432T (NCBI: X51730) presente no exon 4 causa uma substituição de aminoácido na posição V660L, enquanto que a alteração SNPC3764T gera uma mutação silenciosa (H770H). Estas três alterações estão em completo desequilíbrio de ligação e diversos estudos epidemiológicos consideram o polimorfismo PROGINS como sendo modificador de risco para o desenvolvimento de diversas doenças ginecológicas benignas e malignas, condições em que a progesterona desempenha papel crucial [32,41-43].

Em 2007, Romano *et al.* identificaram a existência de modificações na função do receptor da progesterona (PR) decorrentes da influência do polimorfismo PROGINS. Neste estudo foi observado que as alterações funcionais do PR (inserção Alu e a substituição V660L) foram capazes, de maneira independente, de modificar a ação do PR, resultando na diminuição da resposta deste receptor à estimulação hormonal [44].

Dentro do cenário exposto, evidências de que alterações no endométrio estão relacionadas à etiopatogenia da endometriose, e de que estas alterações podem ser por resistência do endométrio a ação da progesterona na endometriose. A presente proposta teve por objetivo avaliar alterações no ciclo celular de culturas primárias de endométrio, de mulheres com endometriose, e que portavam o polimorfismo PROGINS.

Propusemo-nos investigar o efeito da progesterona em culturas primárias de células endometriais estromais, de pacientes com e sem endometriose, portadoras, ou não, do polimorfismo PROGINS no que se refere à viabilidade e proliferação celular, progressão do ciclo celular e apoptose.

Metabolic, Endocrine and Genitourinary Pathobiology

Disrupted Cell Cycle Control in Cultured Endometrial Cells from Patients with Endometriosis Harboring the Progesterone Receptor Polymorphism PROGINS

Paulo D'Amora,* Thiago Trovati Maciel,[†]
Rodrigo Tambellini,[†] Marcelo A. Mori,[‡]
João Bosco Pesquero,[‡] Helio Sato,*
Manoel João Batista Castello Girão,*
Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva,*
and Eduardo Schor*

From the Gynecology Department, Molecular Gynecology and Proteomics Laboratory, Pelvic Pain and Endometriosis Unit; the Nephrology Division,[†] Molecular and Cell Biology Laboratories, and the Department of Biophysics,[‡] Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil*

Presently, little is understood about how endometriosis is established or maintained, or how genetic factors can predispose women to the disease. Because of the crucial role that the progesterone receptor polymorphism PROGINS plays in predisposing women to the development of endometriosis, we hypothesized that this variant may influence critical steps during endometrial cell metabolism that are involved in the pathogenesis of endometriosis. Eutopic endometria were collected from three sources: women with endometriosis who had a single PROGINS allele (from the progesterone receptor gene); women with endometriosis who had the wild-type progesterone receptor allele; and women without endometriosis who had the wild-type allele. Cells prepared from the eutopic endometria of these women were stimulated with both estradiol and progesterone, and then examined for cell proliferation, viability, and apoptosis. The cells from women with endometriosis that carried the PROGINS allele demonstrated increased proliferation, greater viability, and decreased apoptosis following progesterone treatment. In general, these parameters were very different as compared with those of women with endometriosis but without the PROGINS allele and women in the control group. This result indicates there is a reduced level of progesterone responsiveness in women who carry the PROGINS polymorphism. Because progesterone responsiveness is known to be an important characteristic of

women with endometriosis, these data support the contention that the PROGINS polymorphism enhances the endometriosis phenotype. (Am J Pathol 2009, 175:215–224; DOI: 10.2353/ajpath.2009.080966)

Endometriosis is a chronic inflammatory disease characterized by implantation and growth of endometrial tissue outside of the uterus.¹ It affects 10% to 15% of all women of reproductive age, and it is significantly associated with infertility,² chronic pain,³ and morbidity,⁴ making endometriosis a significant problem for public health. In 1925, Sampson et al⁵ suggested that the transtubarian reflux of viable endometrial cells represents the origin of endometriosis. However, several subsequent studies reported that approximately 90% of women have viable endometrial cells in the peritoneal cavity,^{6,7} disputing the notion that retrograde menstruation theory could explain the cause of the disease. It is also noteworthy that only a small portion of women with retrograde menstruation develops endometriosis.

Environmental, endocrine, immune, and genetic factors have all been related to the pathogenesis of endometriosis. Of note, genetic studies of close relatives suggest that there is a 6% increase in the risk of developing endometriosis.⁸ Several studies also suggest that women

Supported by grants (03/04533-1 and 04/09810-6) from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), and Dr. Paulo D'Amora received doctoral fellowship from Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior (CAPES).

Accepted for publication March 24, 2009.

Some preliminary results of this paper were presented at the 10th World Congress on Endometriosis, held in Melbourne, Australia (in March 2008), and it was honored with the "Best Scientific Poster Award" by the World Endometriosis Society (WES) and the Australian Gynaecological Endoscopy Society (AGES).

Address reprint requests to Paulo D'Amora, Ph.D., Molecular Gynecology and Proteomics Laboratory, and Pelvic Pain and Endometriosis Unit, Gynecology Department, Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM). Rua Pedro de Toledo, 781, 4° andar/frente-CEP 04039-032, São Paulo, Brasil. E-mail: paulo.toco@epm.br.

with endometriosis present abnormalities in the eutopic endometrium, raising questions about whether the uterine mucosa is involved in the pathogenesis of the disease.

In that context, modifications of cell cycle control, with increased levels of cell proliferation⁹ and decreased apoptosis,¹⁰ emerge as major mechanisms responsible for endometriosis development. Likewise, enhanced cell adhesion and invasion via increased expression of matrix metalloproteinases and the simultaneous down-regulation of their inhibitors,^{11–13} as well as abnormal sex hormone metabolism,^{14,15} are additional hallmarks of the disease.

Progesterone plays a major role in the processes mentioned above,¹⁶ reinforcing the theory that impaired progesterone function could facilitate the genesis and development of endometriosis.^{17,18} Interestingly, several studies demonstrated that progesterone is able to induce the expression of a large number of genes in the eutopic endometrium. Microarray analysis reported by Burney et al¹⁹ demonstrated that *FOX10*, *MIG6*, and *CYP26A1* expression was significantly modified in the uterine mucosa. In another study, Wang et al used a baboon model of endometriosis and demonstrated that the expression of progesterone responsive factors is altered during the secretory stage of the menstrual cycle, suggesting that progesterone resistance plays a major role in the genesis of endometriosis.²⁰

Several studies have addressed the question of whether genetic mutations contribute to the development of endometriosis. In these studies, several candidate genes and polymorphisms were associated with the development of endometriosis.²¹ One particular candidate, the progesterone receptor (PR) gene variant named PROGINS (NCBI Data Bank accession numbers AF016381 and Z49816), has emerged as an important disease component of endometriosis. PROGINS is characterized by a 306-bp insertion in intron G, which exists in linkage disequilibrium with point mutations in exons 4 and 5.²² Epidemiological studies have shown that women carrying the PROGINS polymorphism have an increased risk for the development of hormone-dependent gynecological disorders, such as endometrial and ovarian carcinomas, recurrent abortions, and uterine fibroids,^{23–28} conditions in which progesterone plays a critical role.

Several researchers, including those in our laboratory, have reported that patients carrying a single PROGINS allele have an increased risk for endometriosis development.^{29–32} In addition, *in vitro* data from Romano et al demonstrated that the PROGINS variant of the PR gene is less responsive to progestins, as compared with wild-type PR, resulting in reduced mRNA stability and protein activity, as well as a diminished ability to efficiently inhibit cell proliferation in rodent ovarian cell lines.³³ Yet the effects of the PROGINS polymorphism on the phenotype of eutopic endometrial cells have never been described. The goal of the present study was to evaluate the influence of the PR variant PROGINS on cell viability, apoptosis, and proliferation in cell cultures of eutopic endometrium from women with and without endometriosis.

Materials and Methods

Study Participants and Sample Collection

Endometrial tissues were obtained from informed volunteers in the Endometriosis Unit/Department of Gynecology at the Federal University of São Paulo (UNIFESP). The Institutional Ethics Review Board (CEP0571/06) had previously approved the study. Women undergoing laparoscopy for routine evaluation of infertility, pelvic pain, or elective tubal sterilization were recruited. All patients had a history of regular menses and were not taking any sex steroids or steroid-modulating medications 3 months before surgery. After general anesthesia and just before the surgical procedure, endometrial tissues were collected using the Nowak's curette. During laparoscopy, a systematic observation of the pelvis was conducted and the patients were assigned to either the endometriosis or the control group. The collected endometrial tissue was separated into two parts: one for histological analysis according to the criteria of Noyes et al³⁴ and the other for cell culture processing. Data for the patients' laparoscopic diagnosis, age, menstrual cycle date, and stage of endometriosis were also recorded (Table 1).

PROGINS Genotyping

Before the endometrial biopsy procedure, peripheral blood samples were obtained from the patients. Genomic DNA (gDNA) was extracted and purified using the GFX DNA extraction kit (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK). Genotyping of the PROGINS polymorphism was performed by PCR as described previously.²⁹ Endometriosis and control groups were subdivided based on detection of PROGINS: control (CP-Alu), endometriosis wild-type homozygous (E-Alu), and endometriosis PROGINS heterozygous (E+Alu).

Tissue Isolation and Culture

Specimens were transported to the laboratory in culture medium supplemented with antibiotics and antimycotics. Tissues were minced into small pieces and treated with collagenase IA (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), as previously described.³⁵ No procedures were performed to isolate epithelial or stromal cells. Cells from each individual specimen were plated in 100-mm diameter culture dishes (TPP, Trasadingen, Switzerland). After 16 hours of incubation, non-adherent cells were washed away. The typical yield of stromal cells using this technique is 90%.³⁶ Cells were grown in phenol-free Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Life Technologies, Inc., Rockville, MD), 100 IU/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich), and 250 µg/ml amphotericin-B (Cultilab, Campinas, Brazil) in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. Adherent cells were characterized by immunofluorescence using specific monoclonal antibodies against cytokeratin (Santa

Table 1. Characteristics of Samples Used in the Study

Groups	Samples	Age (yr)	Cycle date	Stage of endometriosis*	Laparoscopic diagnose	PROGINS genotype	Sample selected for an experiment [+]/Passage no. used								
							IF	qPCR	B/AB	Ct	Tm	CC	V/A	A5	CM
Endometriosis (E-Alu)	1	41	Proliferative	Stage I	Endometriosis	T1/1	+/1, 4-7	+/5	+/5	-	-	+/6	+/7	+/7	-
	2	34	Secretory	Stage I	Endometriosis	T1/1	+/1, 4-7	-	-	-	-	+/6	-	+/7	-
	3	23	Proliferative	Stage II	Endometriosis	T1/1	+/1, 4-7	+/5	+/5	+/5	+/5	+/6	+/7	+/7	-
	4	26	Proliferative	Stage IV	Endometriosis	T1/1	+/1, 4-7	+/5	+/5	-	-	+/6	+/7	+/7	+/5
	5	42	Secretory	Stage I	Endometriosis	T1/1	+/1, 4-7	-	+/5	-	-	-	+/7	-	-
	6	33	Proliferative	Stage I	Endometriosis	T1/1	+/1, 4-7	-	-	-	-	-	+/7	-	-
	7	33	Proliferative	Stage III	Endometriosis	T1/1	+/1, 4-7	-	+/5	+/5	+/5	-	-	-	+/5
	8	35	Proliferative	Stage III	Endometriosis	T1/1	+/1, 4-7	+/5	-	+/5	+/5	+/6	+/7	+/7	-
	9	33	Secretory	Stage II	Endometriosis	T1/1	+/1, 4-7	+/5	+/5	+/5	+/5	+/6	+/7	+/7	+/5
	10	22	Secretory	Stage I	Endometriosis	T1/1	+/1, 4-7	+/5	-	+/5	+/5	+/6	-	+/7	+/5
Endometriosis (E+Alu)	11	24	Proliferative	Stage I	Endometriosis	T1/2	+/1, 4-7	-	+/5	+/5	+/5	+/6	+/7	+/7	+/5
	12	36	Secretory	Stage IV	Endometriosis	T1/2	+/1, 4-7	-	+/5	+/5	+/5	+/6	+/7	+/7	+/5
	13	35	Secretory	Stage I	Endometriosis	T1/2	+/1, 4-7	-	+/5	+/5	+/5	+/6	+/7	+/7	+/5
	14	37	Proliferative	Stage I	Endometriosis	T1/2	+/1, 4-7	-	+/5	+/5	+/5	+/6	+/7	+/7	+/5
	15	28	Secretory	Stage I	Endometriosis	T1/2	+/1, 4-7	-	+/5	+/5	+/5	+/6	+/7	+/7	+/5
	16	29	Proliferative	Stage IV	Endometriosis	T1/2	+/1, 4-7	-	+/5	-	-	-	-	-	-
Control (CP-Alu)	17	31	Secretory	N/A	Normal pelvis	T1/1	+/1, 4-7	-	-	+/5	+/5	-	+/7	-	+/5
	18	38	Secretory	N/A	Ovarian cyst	T1/1	+/1, 4-7	-	+/5	+/5	+/5	-	-	-	+/5
	19	30	Secretory	N/A	Pelvic adhesions	T1/1	+/1, 4-7	+/5	+/5	+/5	+/5	+/6	+/7	+/7	-
	20	26	Proliferative	N/A	Adnexal cyst	T1/1	+/1, 4-7	+/5	+/5	+/5	+/5	+/6	-	+/7	-
	21	36	Proliferative	N/A	Normal pelvis	T1/1	+/1, 4-7	-	-	+/5	-	-	+/7	-	-
	22	33	Proliferative	N/A	Adnexal cyst	T1/1	+/1, 4-7	+/5	+/5	-	-	+/6	+/7	+/7	-
	23	31	Proliferative	N/A	Pelvic adhesions	T1/1	+/1, 4-7	+/5	-	-	-	+/6	+/7	+/7	-
	24	25	Secretory	N/A	Ovarian cyst	T1/1	+/1, 4-7	-	-	-	-	-	+/7	-	+/5
	25	28	Proliferative	N/A	Normal pelvis	T1/1	+/1, 4-7	-	-	-	-	-	+/7	-	+/5
	26	34	Proliferative	N/A	Normal pelvis	T1/1	+/1, 4-7	+/5	+/5	-	-	+/6	+/7	+/7	-

Eutopic endometrium was obtained from control patients (CP-Alu) without the PROGINS allele, and from women with endometriosis with (E+Alu) and without (E-Alu) the single PROGINS allele.

N/A = Not applicable.

PROGINS genotype: T1/1 = homozygous major allele, T1/2 = PROGINS heterozygous.

[+] = sample selected in an experiment, [-] = sample not used.

IF = immunofluorescence, qPCR = time and dose response quantitative real-time PCR for PR; B/AB = PRB/AB mRNA expression ratio; Ct = Cell Counting; Tm = thymidine incorporation assay; CC = cell cycle analysis; V/A = viability and apoptosis (Viacount assay); A5 = Annexin-V labeling; and CM = chromatin morphology analysis. Experiments were performed between passages 4 and 7.

*Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis.

Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and vimentin (Dako Corp., CA). The proportions of cytokeratin-positive cells (endometrial glandular cells) and vimentin-positive cells (endometrial stromal cells) were assessed in each cell culture, as described previously.³⁷ Normal goat serum (Sigma-Aldrich) was used instead of the primary antibody as a negative control. Because the cultures presented high percentages of vimentin-positive cells, human breast ductal carcinoma cells (T47D cell line), which constitutively express cytokeratin in the form of intermediate filaments, were used as positive controls for cytokeratin to ensure the specificity of the method.

Quantitative Real-Time Reverse Transcription PCR

A time-course and dose-response study was conducted with 17β-estradiol (Sigma-Aldrich) to induce optimal progesterone receptor mRNA expression for the cytometric experiments with progesterone.³⁸ Total RNA was extracted from the endometrial cells (RNeasy kit, Qiagen Inc, Hilden, Germany), and the reverse transcriptase reaction (Superscript-III, Invitrogen) was performed with 1 μg of DNase I (G&E Healthcare Biosciences, Upsala, Sweden)-treated

RNA. qPCR was performed using the ABI 7700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the Power SYBr Green Mastermix PCR kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. PCR primers (IDT, Coralville, IA) were synthesized with the following sequences: total progesterone receptor PR (A+B): forward primer 5'-ACACAAAACCTGACACCTCC-3' and reverse primer 5'-TACAGCATCTGCCCACTGAC-3'; progesterone receptor subunit B (PR-B): forward primer 5'-GCCAGAGAAAAAGTCGGGAG-3' and reverse primer 5'-TGGGGAGCGCAAGAAAAAG-3'³⁹; and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): forward primer 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' and reverse primer 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'.⁴⁰ The polymerase chain reaction was performed with the following conditions: one cycle at 95°C for 15 minutes and 35 cycles at 94°C for 15 seconds, 60°C for PR (A+B) and PR-B or 58°C for GAPDH for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. Cycle numbers obtained at the log-linear phase of the reaction were plotted against a standard curve prepared with serially diluted control samples. The expression of target PR (A+B) and PR-B genes was normalized to GAPDH mRNA levels, which were measured concurrently.⁴¹ The specificity of each reaction was confirmed by melting curve analysis and agarose gel electrophoresis.

Viability and Apoptosis Analyses by the Viacount Assay

Endometrial cells (2×10^4) seeded in 6-well plates at 50% to 70% confluence were treated with 100 nmol/L 17β -estradiol for 24 hours, followed by 100 nmol/L progesterone for 24 hours. Cells were mixed with Guava Viacount reagent and allowed to stain for 10 minutes (Guava Technologies, Hayward, CA). The Guava System differentiates viable from non-viable cells by detecting fluorescence signals from two fluorescent DNA-binding dyes: one membrane-permeable dye stains all nucleated cells while the second dye enters cells when membrane integrity has been compromised, ie, non-viable cells.⁴² Viable cells were quantified using a Guava Personal Analyzer (PCA) flow cytometer (Guava Technologies), according to the manufacturer's specifications.

Quantification of Apoptotic Cells by Annexin V Labeling

Endometrial cells (2×10^4) seeded in 6-well plates at 50% to 70% confluence were treated with 100 nmol/L 17β -estradiol for 24 hours, followed by 100 nmol/L progesterone for an additional 24 hours. To detect apoptosis, the cells were double stained with annexin V and nexin 7-AAD, according to the manufacturer's recommendations (Guava Nexin Method; Guava Technologies). Cell-associated fluorescence was analyzed using a Guava PCA flow cytometer (Guava Technologies). Results were expressed as the percentage of apoptotic-positive cells. Both early apoptotic (annexin V-positive) and late apoptotic (annexin V and 7-AAD-positive) cells were included in the analysis.⁴³

Quantification of Apoptotic Cells by Chromatin Morphology Analysis

Endometrial cells (3×10^4) were seeded in 6-well plates and cultured until subconfluence (50% to 70%), at which time the cells were serum-deprived for 24 hours. After treating the cells with 100 nmol/L 17β -estradiol for 24 hours followed by 100 nmol/L progesterone stimulation for 24 hours, 0.5 μ g/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) was added to the medium for 30 minutes at 37°C. Attached and non-attached cells were collected and analyzed by UV fluorescence microscopy ($\times 400$). Apoptosis was evaluated based on chromatin morphology.⁴⁴ Two hundred cells per sample were counted. Results are expressed as the percentage of apoptotic cells in the solution.

DNA Synthesis by the [3 H]-Thymidine Incorporation Assay

Endometrial cells (2×10^4) were grown in 24-well plates until 50% to 70% confluence was attained, and then quiescence of the cells was achieved by addition of phenol/serum-free Dulbecco's Modified Eagle's Medium

for 24 hours. Cells were treated with 100 nmol/L 17β -estradiol for 24 hours, followed by 100 nmol/L progesterone for 20 hours. After 14 hours of progesterone exposure, cells were labeled with 1 μ Ci/ml [3 H]-methylthymidine (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) for 6 hours. At the end of this period, the cells were washed in saline solution and methanol, and precipitated with trichloroacetic acid. Samples were dissolved with NaOH and diluted in scintillation buffer. Radioactivity was measured in a Packard Tri-Carb LS β -counter (PerkinElmer, Wellesley, MA).

Cell Number Measurement

Changes in the number of cells were determined by flow cytometry using the Guava Viacount kit (Guava Technologies). Briefly, 1.5×10^4 endometrial cells were plated and grown until a confluence of 50% to 70% was attained. Synchronization of the cell cycle was then induced by serum-starvation for 24 hours. Furthermore, the cells were stimulated with 100 nmol/L 17β -estradiol for 24 hours, followed by another 24 hours of 100 nmol/L progesterone treatment, during which the cells were counted at specified time points (three times per well). Results are expressed as the number of cells/ml.

Cell Cycle Analysis

Endometrial cells (2×10^5) were seeded in 100-mm dishes and grown until a confluence of 50% to 70% was reached. After synchronization of the cell cycle by serum starvation for 24 hours, cells were stimulated with 100 nmol/L 17β -estradiol for 24 hours, followed by treatment with 100 nmol/L progesterone in phenol-free Dulbecco's Modified Eagle's Medium for an additional 24 hours. Cells were fixed with 70% ethanol for 1 hour, stained with propidium iodide, and cell cycle populations were determined using the Guava EasyCyt system, according to the manufacturer's recommendations (Guava Technologies). The Guava Cell Cycle software was used to determine cell populations in the different cell cycle phases, while the amount of propidium iodide was quantified in the G0/G1, S, and G2/M phases.⁴⁵

Statistical Analyses

Statistical analysis was performed with the Statistical Package for Social Sciences (SPSS v14.0). Comparisons between two groups were made using the Student's *t*-test (paired). Analysis of variance was applied whenever differences among three or more groups were analyzed. When a positive global difference between groups was found, *post hoc* Tukey's Honestly Significant Difference test (when variances were homogeneous) or Games Howell (when variances were considered unequal) tests were performed to identify which coupled groups presented significant differences. qPCR values were \log_2 -transformed before the analysis. At least four biological replicates were analyzed in each experimental group. Data are expressed as the ratio between hormonal treat-

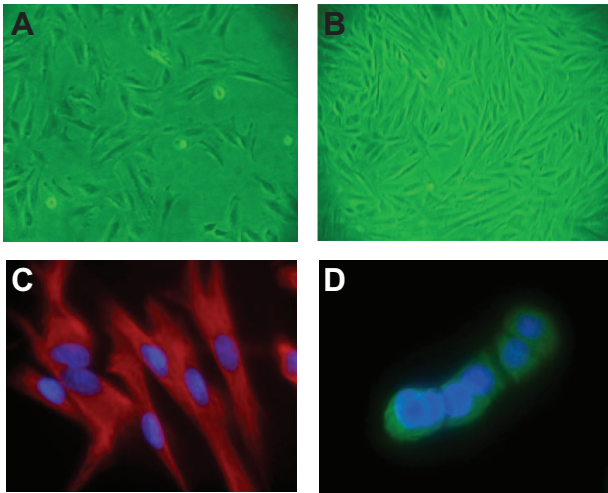


Figure 1. Figures **A** and **B** show nonconfluent and subconfluent endometrial cells from eutopic endometrium used in all experiments. Triple immunofluorescence for vimentin (red), cytokeratin (green), and 4,6-diamidino-2-phenylindole for the nuclei, was performed to characterize percentages of endometrial mesenchymal (**C**) and epithelial constituents in each sample. Figure (**D**) shows T47D cells used as positive controls for cytokeratin staining. Magnification = original $\times 200$ (**A**), $\times 100$ (**B**), and $\times 400$ (**C** and **D**).

ment and basal conditions in the majority of experiments, and $P < 0.05$ was considered as significant.

Results

Experimental Subjects

Endometrial biopsies from 16 patients with endometriosis, age 31.2 ± 4 years (mean \pm SEM), were staged according to the guidelines from the American Society for Reproductive Medicine⁴⁶ and were selected for the study. For comparison, endometrial biopsies were obtained from 10 women (age 31.9 ± 6) submitted for laparoscopy for benign ovarian cysts without signs of endometriosis in the pelvis. Tissues were collected at various times during the menstrual cycle and were dated according to Noyes' criteria.³⁴ No homozygous cases of PROGINS were included in the study, and all of the listed endometrial biopsies yielded viable cell cultures (Table 1).

Endometrial Cell Culture

Cell cultures were established from human endometrial tissues as described by Piva et al.³⁶ Cultures reached 90% to 95% confluence within 3 ± 1 day (mean \pm SEM) of the initial isolation (Figure 1, A and B). Cells were used from passages 3 until 7, and cell characterization was performed for each passage used in the experiments. The results from each passage showed approximately 90% vimentin-positive cells in all samples, as indicated by immunofluorescence microscopy (Figure 1, C and D). Cells were frozen at the third passage, and experiments were performed using cells from subsequent passages to ensure that a homogeneous population of cells was used for each phenotypic analysis (Table 1).

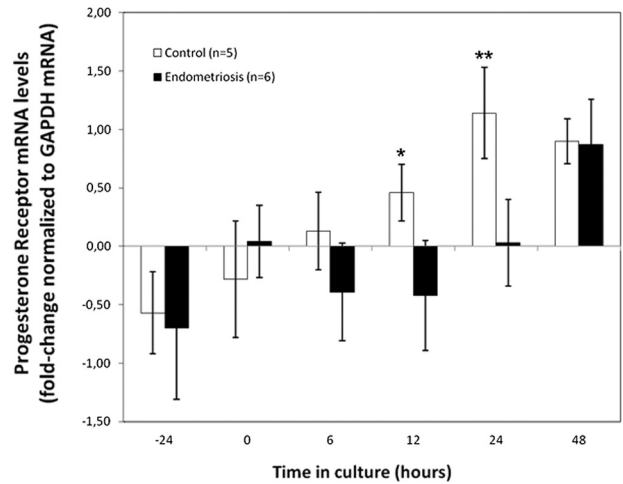


Figure 2. Quantitative real-time PCR analysis for progesterone receptor (PR) was performed from samples of eutopic endometrium with cDNA from controls and endometriosis without the PROGINS allele. Time course induction of PR by 100 nmol/L 17 β -estradiol for 6 hours, 12 hours, 24 hours, and 48 hours of exposure was applied to determine optimum concentration of progesterone used as treatment for cytometric analyses. PR was also detected in basal conditions (Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 10% fetal bovine serum and serum-free medium) before estradiol exposure (indicated as -24 hours and 0). Control ($n = 5$) vs. endometriosis ($n = 6$). Differences among studied groups appeared after 12 hours ($*P = 0.05$), and reached highest significance at 24 hours ($**P = 0.047$). Expression levels were normalized by GAPDH and compared with baseline. The 100 nmol/L E2 treatment for 24 hours followed by the same regimen with progesterone was the chosen procedure for all cytometric studies.

Induction of PR mRNA Expression by 17 β -Estradiol and PRB/PRAB Ratio Analysis

Endometrial cell cultures were treated with 100 nmol/L 17 β -estradiol (E2) for different time periods, and total PR mRNA levels were analyzed by real-time PCR. PR showed a time-dependent modulation for both groups (Figure 2), but demonstrated more significant results for the controls (6 hours to 12 hours, $P = 0.44$; 6 hours to 24 hours, $P = 0.04$; 6 hours to 48 hours, $P = 0.007$) when compared with the endometriosis group (6 hours to 12 hours, $P = 0.91$; 6 hours to 24 hours, $P = 0.23$; 6 hours to 48 hours, $P = 0.04$). This pattern was also noticed 24 hours before the time course study, when the cells were maintained in phenol-free Dulbecco's Modified Eagle's Medium containing 10% fetal bovine serum (-24 hours) immediately before serum-deprivation for 24 hours (0 hours) and E2 treatment (6 to 48 hours). Administration of 1 nmol/L or 10 nmol/L E2 did not modulate PR expression levels (data not shown). Significant differences among groups began to appear only after 12 hours of treatment ($P = 0.05$), and increased after 24 hours ($P = 0.047$). Interestingly, up-regulation of PR in the endometriosis group was noticed only 48 hours after E2 treatment, at which time it reached the same levels displayed by the control cells ($P = 0.94$). This delayed PR gene transcription could suggest a resistance mechanism in endometrial cells from women with endometriosis (Figure 2). Analysis of cells carrying the PROGINS polymorphism and consideration of the individual expression levels of PR subunits during the 24 hours treatment (Figure 3) revealed higher PRB mRNA expression levels in the con-



Figure 3. Analysis of the PRB/PRAB balance at transcriptional levels by quantitative real-time PCR using total RNA from samples of endometrial cells from CP-Alu ($n = 5$), E-Alu ($n = 6$), and E+Alu ($n = 6$) groups, after treatment with 100 nmol/L 17 β -estradiol for 24 hours. * $P = 0.0485$ (CP-Alu versus E+Alu). GAPDH was used to normalize the values. Experiments were performed in triplicate. The statistical significance was determined using Student's *t*-test.

trol group (0.82 ± 0.410) compared with the endometriosis E-Alu (0.31 ± 0.047) and E+Alu (0.16 ± 0.049) groups. The mean ratio of PRB to PRAB (PRA+PRB) mRNA expression was decreased in the endometriosis group consisting of PROGINS carriers (0.31 ± 0.070) as compared with the endometriosis group of non-carriers (0.53 ± 0.158) and the controls (1.32 ± 0.483). However, the mean ratio was also significantly lower when the E+Alu and CP-Alu groups were compared ($P = 0.048$), whereas the CP-Alu versus E-Alu ($P = 0.12$) and E-Alu versus E+Alu ($P = 0.24$) comparisons were not significant (Figure 3).

Effects of Progesterone on Cell Viability and Apoptosis

Analysis of cell culture phenotypes revealed sustained viability and decreased apoptosis in E+Alu cells compared with the CP-Alu ($P < 0.05$) and E-Alu ($P < 0.05$) groups (Figure 4, A and B). Lower percentages of apoptotic cells were observed in the E+Alu group compared with CP-Alu and E-Alu based on chromatin morphology analysis after progesterone administration (Figure 5A, CP-Alu $6.8\% \pm 0.7$, E-Alu $5.7\% \pm 1.3$, E+Alu $2\% \pm 0.3$, E+Alu versus CP-Alu, $P = 0.001$; E+Alu versus E-Alu, $P = 0.006$). Annexin-V labeling (Figures 4B and 5B) permitted identification of viable (CP-Alu $7.2\% \pm 0.9$, E-Alu $8.7\% \pm 0.3$, E+Alu $10.8\% \pm 0.6$), early apoptotic (CP-Alu $14.7\% \pm 4.1$, E-Alu $13.5\% \pm 1.8$, E+Alu $8.9\% \pm 1.2$), and late apoptotic cells (CP-Alu $32.2\% \pm 5.3$, E-Alu $16.5\% \pm 1.2$, E+Alu $7.8\% \pm 1.7$). The decrease in cell viability and induction of apoptosis were monitored by flow cytometry with the Viacount kit under basal conditions and after a pulse of 100 nmol/L progesterone for 24 hours (Figure 5, C and D).

Effects of Progesterone on Cell Proliferation

DNA synthesis analysis by [3 H]-thymidine incorporation revealed that both the CP-Alu and E-Alu groups significantly differed from the E+Alu group (Figure 6A; CP-Alu $146 \pm 40\%$, E-Alu $224 \pm 9\%$, E+Alu $490 \pm 21\%$, CP-Alu versus E-Alu, $P = 0.27$; CP-Alu versus E+Alu, $P = 0.002$), suggesting that the presence of PROGINS can increase the proliferation of cells treated with 17 β -estradiol and progesterone. This data were confirmed by cell proliferation analysis, in which the number of cells relative to the

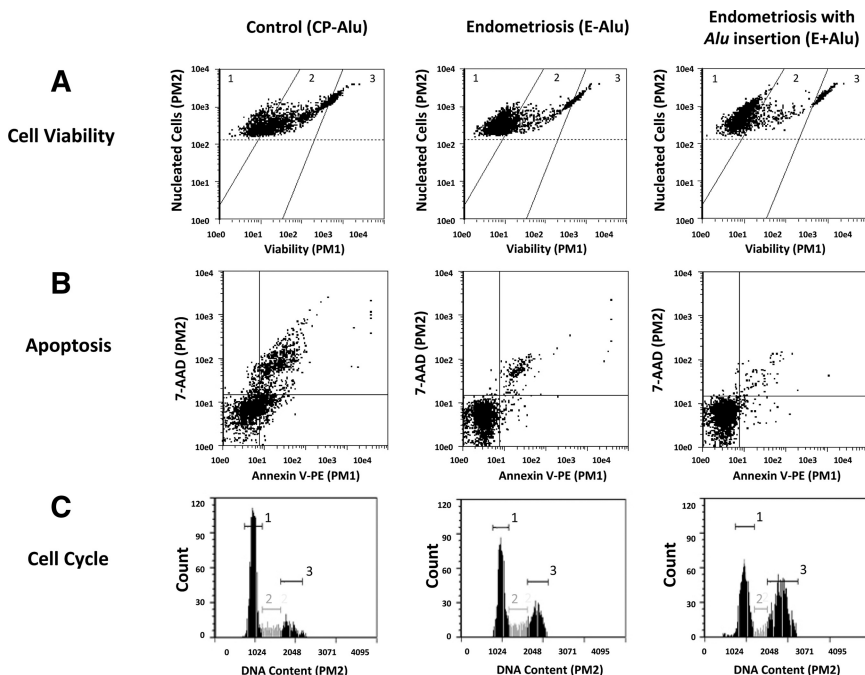


Figure 4. Flow cytometry diagrams of representative experiments with progesterone acquired and analyzed by the Guava CytoSoft (v2.0) Software. Line (A) represents the cell viability analysis representing the distinction of viable (1), apoptotic (2) and dead (3), cells dependent on the incorporation of the Viacount dyes. Line (B) shows percentages of apoptotic cells determined by Annexin-V labeling with standard quadrant gating: annexin-V negative/7-AAD negative (alive), annexin-V positive/7-AAD negative (early apoptotic), annexin-V positive/7-AAD positive (late apoptotic) and annexin-V negative/7-AAD positive (necrotic) cells. In line (C) the cell cycle analysis was applied to determine percentages of cell populations in different phases of the cell cycle, and propidium iodide was quantified from the G0/G1 (1), S (2), and G2/M (3) stages.

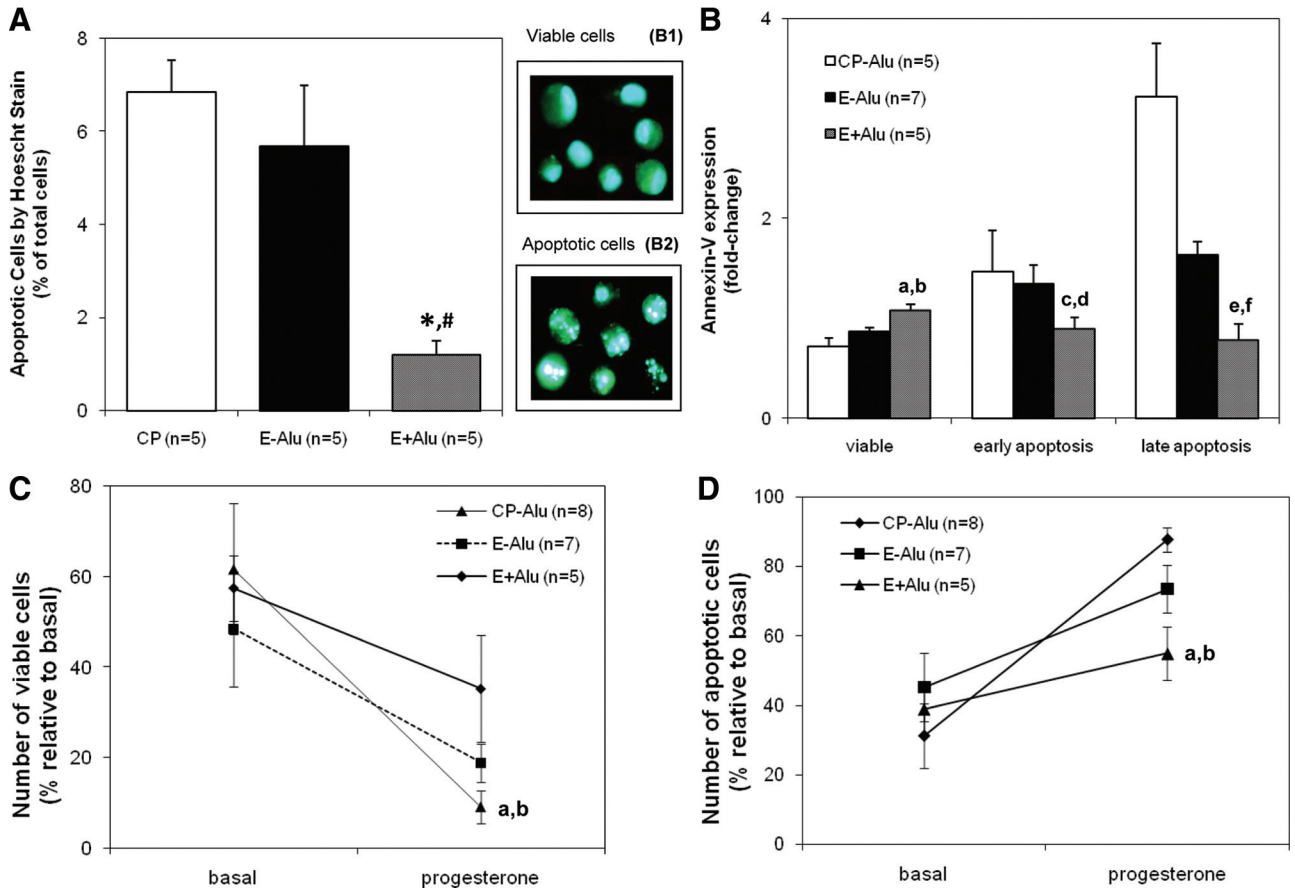


Figure 5. Progesterone fails to promote death in endometrial cells with PROGINs. Endometrial cells were serum-deprived and treated with 100 nmol/L progesterone for 24 hours. Apoptosis was measured by flow cytometry with the annexin-V labeling kit (A) which allows the detection of viable (^aE+Alu versus CP-Alu and ^bE+Alu versus E-Alu; ^a*P* = 0.002, ^b*P* = 0.05), early apoptotic (^cE+Alu versus CP-Alu and ^dE+Alu versus E-Alu; ^c*P* = 0.42, ^d*P* = 0.13); and late apoptotic cells (^eE+Alu versus CP-Alu and ^fE+Alu versus E-Alu; ^e*P* = 0.02, ^f*P* = 0.01). Apoptosis was detected morphologically with Hoechst 3342 staining (B), where viable (B1) and apoptotic nuclei (B2) were distinguished: ^aE+Alu versus CP-Alu (*P* = 0.001), and ^eE+Alu versus E-Alu (*P* = 0.006); and the Viacount assay (C): which monitors apoptosis (^aE+Alu versus CP-Alu, and ^bE+Alu versus E-Alu; ^a*P* < 0.0001, ^b*P* = 0.003); and cell viability (D): (^aE+Alu versus CP-Alu, and ^bE+Alu versus E-Alu; ^a*P* = 0.04, ^b*P* = 0.15).

corresponding number under basal conditions was counted (Figure 6B; CP-Alu 1.5 ± 0.10 -fold-change, E-Alu 1.71 ± 0.11 -fold-change, E+Alu 2.19 ± 0.16 -fold-change; CP-Alu versus E-Alu, *P* = 0.47; CP-Alu versus E+Alu, *P* < 0.01). Both methods demonstrated that cells

carrying the PROGINs polymorphism exhibit higher proliferation rates than CP-Alu and E-Alu cells (Spearman Correlation of 0.554, *P* = 0.04). A cell cycle analysis (Figure 4C) also confirmed this tendency, revealing exuberant progression to S and G2/M phases in the E+Alu

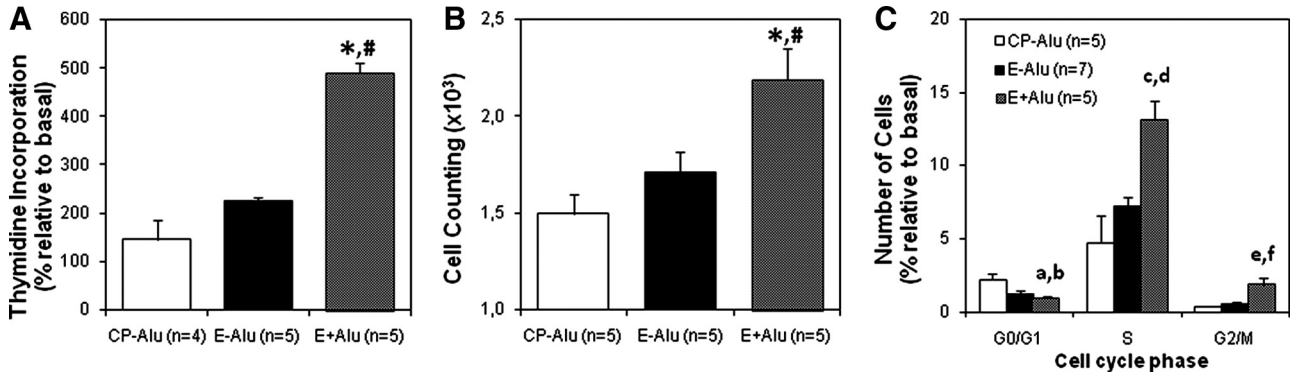


Figure 6. Cell proliferation was monitored by the [³H]-thymidine incorporation assay (A), after synchronization with serum starvation, followed by consecutive treatments with 100 nmol/L 17β-estradiol and progesterone both for 24 hours. ^aE+Alu versus CP-Alu (*P* = 0.002), and ^eE+Alu versus E-Alu (*P* = 0.0001). Similar hormonal stimuli were used to monitor cell counting (B): 6-well plates were seeded with 5×10^3 cells at day 0 and counted again after treatment. Electronic cell counts were performed in triplicate. Cell cycle analysis (C) showed progression of E+Alu (in relation to CP-Alu and E-Alu) throughout the cell cycle into S and G2/M phases. ^aE+Alu versus CP-Alu (*P* = 0.01), and ^eE+Alu versus E-Alu (*P* = 0.04). G0/G1 (^a*P* = 0.07, ^b*P* = 0.15), S (^c*P* = 0.001, ^d*P* = 0.01), and G2/M (^e*P* = 0.05, ^f*P* = 0.14).

group compared with the CP-Alu ($P = 0.001$) and E-Alu ($P = 0.01$) groups (Figure 6C).

Discussion

The etiology of endometriosis has been exhaustively studied over recent decades. Several studies have focused at the endometrial cellular and molecular levels to understand the pathogenesis of ectopic endometriosis.⁴⁷ Some of the proposed mechanisms point to progesterone as the main effector in the process. An increasing number of studies describe the differential PR gene expression and signaling that occur in patients with endometriosis, suggesting that progesterone resistance in the endometrium⁴⁸ may cause this differential response, purported to be one of the mechanisms responsible for the development of endometriosis.

Progesterone signaling depends on interactions between the hormone and its receptors.⁴⁹ It was recently shown that progesterone signaling is blocked in cells carrying the PROGINS allele and the V660L mutation on exon 4 of the PR gene. Indeed, comparisons with rodent ovarian (CHO) cells carrying common polymorphic variants for PR gene demonstrated that cells with the PROGINS allele display diminished PR mRNA stability, altered post-translational modifications (such as phosphorylation), and modified protein degradation patterns, which may account for the disrupted response to progesterone.³³

The present study demonstrates that there are significant alterations in the cellular phenotype of women with endometriosis carrying the PROGINS polymorphism using an *in vitro* model consisting of endometrial cell cultures exposed to progesterone. It suggests that the PROGINS polymorphism promotes changes in the cellular phenotype that lead to disrupted cell cycle control in the endometrium, reinforcing the hypothesis that endometrial resistance to progesterone could have deleterious effects and contribute to the genesis of endometriosis.⁵⁰

Analysis of the cell culture phenotype of eutopic endometrium from women diagnosed with endometriosis allowed us to perform a comprehensive study of cell proliferation, viability, and apoptosis. This approach provided more reliable results, illustrating that the *in vitro* model is appropriate for such a comprehensive study. Because the cells were not manipulated to establish pure cultures of stromal or epithelial cells, possible sources of stress that could trigger cell differentiation, signaling mechanisms, or other kinds of perturbations were avoided.

One limitation of the study is the absence of any homozygous PROGINS samples, mainly because of their low frequency in our population.²⁹ Another issue is the absence of disease-free women with a single PROGINS allele. Such a group would be helpful in proving the relationship between PROGINS and the cell cycle deregulation observed in endometriosis.

Progesterone signaling is mediated by two functionally distinct receptor isoforms (PRA and PRB) that are expressed from a single gene at which transcription can

occur from two alternative promoters.⁵¹ Some studies have revealed that the mRNA ratio of PRA to PRB is critical for the cellular response to progesterone. In addition, the relative expression of PRA and PRB is species-dependent and differs in each cellular context.⁵²⁻⁵⁵ In human gynecological cancers, especially ovarian cancers, the dominant expression of PRB mRNA is a marker for a malignant phenotype.⁵⁶ With respect to endometriosis, Misao et al⁵⁷ showed that PRB mRNA is highly expressed in endometrioma. A recent study from Wu et al⁵⁸ demonstrated how knockdown of PRB can promote cell proliferation in immortalized endometrial stromal cells. In the present study, we observed that endometrial cells carrying the PROGINS polymorphism exhibit a decreased expression ratio of PRB to PRAB mRNA when compared with E-Alu and CP-Alu samples. This evidence suggests that PRA and PRB mRNA expression in endometriosis might be altered in the presence of PROGINS, which could lead to a disruption in the control of progesterone effects and responses to sex steroid-mediated growth regulation.

Progesterone is described as an inhibitor of endometrial cell proliferation.⁵⁹ In cultured endometrial cells from women with endometriosis carrying the PROGINS allele, a significant increase in cell proliferation after treatment with progesterone was observed compared with controls and cells from non-carrier women with endometriosis. This finding could indicate an impaired ability of progesterone to inhibit cell proliferation, an expected effect of this hormone.⁶⁰

Cell proliferation is, in fact, a balance between cells that progress through the cell cycle and those that undergo cell death. For this reason, we also evaluated the effect of PROGINS on cell apoptosis and cell cycle progression. Interestingly, apoptosis is less pronounced in the eutopic and ectopic endometrium of patients with endometriosis.⁶¹ Our results show impaired induction of cell death by apoptosis after progesterone stimulation of cells from the endometriosis group with PROGINS, in contrast to the non-carriers and controls. An analogous pattern was observed for cell viability, as evidenced by endometriosis cells presenting sustained viability after progesterone stimulation; especially those with PROGINS. This information clearly shows that progesterone was unable to induce death by apoptosis in cells carrying the PROGINS allele. Additionally, the disparity between both endometriosis groups may explain why some women with endometriosis respond differently than others to progesterone-based therapies and why such therapies fail to treat the disease. Nonetheless, studies examining larger numbers of samples from different stages will be necessary to test the role of this polymorphism in the progression of the disease.

Our results show that the presence of PROGINS significantly influenced the behavior of cultured endometrial cells. Our results suggest that this polymorphism may be involved in the pathogenesis of the disease, and that further studies are necessary to clarify the role of PROGINS in different aspects of endometriosis.

The identification of genetic markers related to the genesis of endometriosis is critical for developing pre-

ventive strategies. Considering our results, further *in vivo* and epidemiological studies are required to better understand the relevance of PROGINS to the cellular response to progesterone, and its role in the development of endometriosis. Such information would be vital to developing novel therapeutic approaches or to using traditional therapies in a more patient-specific manner.

Acknowledgments

We thank the physicians from the Pelvic Pain and Endometriosis Unit, Gynecology Department (UNIFESP-EPM) for providing endometrial tissue and detailed clinical information about the patients. We are grateful to Mr. Marcelo Anéas (Product Specialist from G&E Healthcare Bio-Sciences, Brazilian Branch) for his assistance with Flow Cytometry, and to Dr. Camila S.C. Guindalini for her advice regarding Statistics. We are also thankful to Mr. Ivan H. Cordeiro for precious technical help at the Cell Culture Facility (Biophysics Dept., UNIFESP-EPM). We were impressed with his enthusiasm and dedication to cell culture. We also thank Ms. Rita C.S. Figueria, MSc., and Professor Mari C. Sogayar (Chemistry Institute, University of São Paulo, IQ-USP) for their valuable help with quantitative PCR analysis of PRB.

References

1. Bulun SE: Endometriosis. *N Engl J Med* 2009, 360:268–279
2. Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A: Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 2008, 90:247–257
3. Ozawa Y, Murakami T, Terada Y, Yaegashi N, Okamura K, Kuriyama S, Tsuji I: Management of the pain associated with endometriosis: an update of the painful problems. *Tohoku J Exp Med* 2006, 210:175–188
4. Gao X, Outley J, Botteman M, Spalding J, Simon JA, Pashos CL: Economic burden of endometriosis. *Fertil Steril* 2006, 86:1561–1572
5. Sampson JA: Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of the endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927, 14:422–469
6. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM: Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984, 64:151–154
7. Liu DT, Hitchcock A: Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol* 1986, 93:859–862
8. Kennedy S: The genetics of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999, 82:129–133
9. Schor E, Silva IDCG, Sato H, Baracat EC, Girão MJBC, Freitas V: P27Kip1 is down-regulated in the endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2008, 90:2086–2090
10. Harada T, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, Paschopoulos M, Paraskevaidis E, Terakawa N: Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update* 2004, 10:29–38
11. Collete T, Maheux R, Mailloux J, Akoum A: Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in the eutopic endometrial tissue of women with endometriosis. *Hum Reprod* 2006, 21:3059–3067
12. Collete T, Bellehumeur C, Kats R, Maheux R, Mailloux J, Villeneuve M, Akoum A: Evidence for an increased release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of matrix metalloproteinase-9. *Hum Reprod* 2004, 19:1257–1964
13. Chung HW, Wen Y, Chun SH, Nezhat C, Woo BH, Lake Polan M: Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with

- endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness. *Fertil Steril* 2001, 75:152–159
14. Kitawaki J, Kusuki I, Koshiba H, Tsukamoto K, Fushiki S, Honjo H: Detection of aromatase cytochrome P-450 in endometrial biopsy specimens as a diagnostic test for endometriosis. *Fertil Steril* 1999, 72:1100–1106
15. Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S, Johns A, Meng L, Putman M, Carr B, Bulun SE: Deficient 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17 β -estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 83:4474–4480
16. Fang Z, Yang S, Lydon JP, DeMayo F, Tamura M, Gurates B, Bulun SE: Intact progesterone receptors are essential to counteract the proliferative effect of estradiol in a genetically engineered mouse model of endometriosis. *Fertil Steril* 2004, 82:673–678
17. Gazvani R, Templeton A: New considerations for the pathogenesis of endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2002, 76:117–126
18. Vinatier D, Cossou M, Dufour P: Is endometriosis an endometrial disease? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000, 91:113–125
19. Burney RO, Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Nyegaard M, Nezhat CR, Lessey BA, Giudice LC: Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology* 2007, 148:3814–3826
20. Wang C, Mavrogianis PA, Fazleabas AT: Endometriosis is associated with progesterone resistance in the baboon (*Papio anubis*) oviduct: evidence based on the localization of oviductal glycoprotein 1 (OVGP1). *Biol Reprod* 2009, 80:272–278
21. Tempfer CB, Simoni M, Destenaves B, Fauser BCJM: Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: part II – endometriosis. *Hum Reprod Update* 2009, 15:97–118
22. Rowe SM, Coughlan SJ, McKenna NJ, Garrett E, Kieback DG, Carney DN, Headon DR: Ovarian carcinoma-associated TaqI restriction fragment length polymorphism in intron G of the progesterone receptor gene is due to an Alu sequence insertion. *Cancer Res* 1995, 55:2743–2745
23. Junqueira MG, da Silva ID, Nogueira-de-Souza NC, Carvalho CV, Leite DB, Gomes MT, Baracat EC, Lopes LA, Nicolau SM, Goncalves WJ: Progesterone receptor (PROGINS) polymorphism and the risk of endometrial cancer development. *Int J Gynecol Cancer* 2007, 17:229–232
24. Pijnenborg JM, Romano A, Dam-de Veen GC, Dunselman GA, Fischer DC, Groothuis PG, Kieback DG: Aberrations in the progesterone receptor gene and the risk of recurrent endometrial carcinoma. *J Pathol* 2005, 205:597–605
25. Leite DB, Junqueira MG, de Carvalho CV, Massad-Costa AM, Gonçalves WJ, Nicolau SM, Lopes LA, Baracat EC, da Silva ID: Progesterone receptor (PROGINS) polymorphism and the risk of ovarian cancer. *Steroids* 2008, 73:676–680
26. Romano A, Lindsey PJ, Fischer DC, Delvoux B, Paulussen AD, Janssen RG, Kieback DG: Two functionally relevant polymorphisms in the human progesterone receptor gene (C331G/A and progins) and the predisposition for breast and/or ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006, 101:287–295
27. Schweikert A, Rau T, Berkholtz A, Allera A, Daufeldt S, Wildt L: Association of progesterone receptor polymorphism with recurrent abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004, 113:67–72
28. Gomes MT, Castro Rde A, Villanova FE, da Silva ID, Baracat EC, de Lima GR, Girao MJ: The progesterone receptor gene polymorphism. PROGINS, may be a factor related to the development of uterine fibroids. *Fertil Steril* 2007, 87:1116–1121
29. De Carvalho CV, Nogueira-De-Souza NC, Massad-Costa AM, Baracat EC, Girão MJBC, D'Amora P, Schor E, Silva IDCG: Genetic polymorphisms of cytochrome P450c17a (CYP17) and progesterone receptor genes (PROGINS) in the assessment of endometriosis risk. *Gynecol Endocrinol* 2007, 23:29–33
30. Lattuada D, Somigliana E, Viganò P, Candiani M, Pardi G, Di Blasio AM: Genetics of endometriosis: a role for the progesterone receptor gene polymorphism PROGINS? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004, 61:190–194
31. Wieser F, Schneeberger C, Tong D, Tempfer C, Huber JC, Wenzl R: PROGINS receptor gene polymorphism is associated with endometriosis. *Fertil Steril* 2002, 77:309–312
32. van Kaam KJ, Romano A, Schouten JP, Dunselman GA, Groothuis PG: Progesterone receptor polymorphism +331G/A is associated

- with a decreased risk of deep infiltrating endometriosis. *Hum Reprod* 2007, 22:129–135
33. Romano A, Delvoux B, Fischer D-M, Groothuis P: The PROGINS polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone. *J Mol Endocrinol* 2007, 38:331–350
 34. Noyes RW, Hertig AT, Rock J: Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975, 122:262–263
 35. Sharpe KL, Zimmer RL, Griffin WT, Penney LL: Polypeptides synthesized and released by human endometriosis differ from those of the uterine endometrium in cell and tissue explant culture. *Fertil Steril* 1993, 60:839–851
 36. Piva M, Horowitz GM, Shape-Timms KL: Interleukin-6 differentially stimulates haptoglobin production by peritoneal and endometriotic cells in vitro: a model for endometrial-peritoneal interaction in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86:2553–2561
 37. Sharpe KL, Zimmer RL, Khan RS, Penney LL: Proliferative and morphogenic changes induced by the coculture of rat uterine and peritoneal cells: a cell culture model for endometriosis. *Fertil Steril* 1992, 58:1220–1229
 38. Ing NH, Tornesi MB: Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol Reprod* 1997, 56:1205–1215
 39. Zhang W, Mazella J, Kloosterboer HJ, Tseng L: Effects of tibolone on nuclear receptors in human endometrial cells. *Am J Obstet Gynecol* 2006, 195:97–102
 40. Maciel TT, Melo RS, Schor N, Campos AH: Gremlin promotes vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *J Mol Cell Cardiol* 2008, 44:370–379
 41. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001, 29:2002–2007
 42. Hill RP, Wheeler P, MacNeil S, Haycock JW: α -Melanocyte stimulating hormone cytoprotective biology in human dermal fibroblast cells. *Peptides* 2005, 26:1150–1158
 43. Voisin T, Firar AE, Avondo V, Laburthe M: Orexin-induced apoptosis: the key role of the seven-transmembrane domain orexin type 2 receptor. *Endocrinology* 2006, 147:4977–4984
 44. Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH: Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis: countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* 1996, 79:748–756
 45. Maussang D, Verzijl D, van Walsum M, Leurs R, Holl J, Pleskoff O, Michel D, van Dongen GAMS, Smit MJ: Human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 2006, 103:13068–13073
 46. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997, 67:817–821
 47. Giudice LC, Kao LC: Endometriosis. *Lancet* 2004, 364:1789–1799
 48. Jackson KS, Brudney A, Hastings JM, Mavrogianis PA, Kim JJ, Fazleabas AT: The altered distribution of the steroid hormone receptors and the chaperone immunophilin FKBP52 in a baboon model of endometriosis is associated with progesterone resistance during the window of uterine receptivity. *Reprod Sci* 2007, 14:137–150
 49. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP, De Mayo FJ: Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms lessons from knock-out mice. *Mol Cell Endocrinol* 2001, 179:97–103
 50. Bulun SE, Cheng Y-H, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Attar E, Innes J, Kim JJ: Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 2006, 248:94–103
 51. Punyadeera C, Verbost P, Groothuis P: Oestrogen and progestin responses in human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003, 84:393–410
 52. Schrader WT, O'Malley BW: Progesterone-binding components of chick oviduct: characterization of purified subunits. *J Biol Chem* 1972, 247:51–59
 53. Feil PD, Clarke CL, Shine J, Sutherland RL: Progestin-mediated changes in progesterone receptor forms in the normal human endometrium. *Endocrinology* 1988, 123:2506–2513
 54. Loosfelt H, Logeat F, Vu Hai MT, Milgrom E: The rabbit progesterone receptor: evidence for a single steroid-binding subunit and characterization of receptor mRNA. *J Biol Chem* 1984, 259:14196–14202
 55. Schneider W, Ramachandran C, Satyaswaroop PG, Shyamala G: Murine progesterone receptor exists predominantly as the 83-kilodalton A form. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991, 38:285–291
 56. Fujimoto J, Ichigo S, Hori M, Nishigaki M, Tamaya T: Expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in gynecologic malignant tumors. *Tumor Biol* 1995, 16:254–260
 57. Misao R, Iwagaki S, Fujimoto J, Sun W, Tamaya T: Dominant expression of progesterone receptor form B mRNA in ovarian endometriosis. *Horm Res* 1999, 52:30–34
 58. Wu Y, Shi X, Guo SW: The knockdown of progesterone receptor isoform B (PR-B) promotes proliferation in immortalized endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2008, 90:1320–1323
 59. Mulac-Jericevic B, Conneely OM: Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 2004, 128:139–146
 60. Béliard A, Noël A, Foidart JM: Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril* 2004, 82:80–85
 61. Chrobak A, Sieradzka U, Sozanski R, Chelmoriska-Soyta A, Gabrys M, Jerzak M: Ectopic and eutopic stromal endometriotic cells have a damaged ceramide signaling pathway to apoptosis. *Fertil Steril* 2008. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.09.035

Com os crescentes indícios de que alterações endometriais estão envolvidas na gênese da endometriose, de que estas alterações são decorrentes de uma, eventual, resistência desta mucosa á progesterona e de que a variante genética PROGINS pode ser responsável por este fenômeno, procuramos avaliar se a presença deste polimorfismo levaria a alterações fenotípicas do ciclo celular neste tecido. Acreditamos que a melhor forma para testar esta hipótese seja por meio de cultivo celular, já que permite a avaliação dinâmica do endométrio à exposição à progesterona. Outros estudos já utilizaram cultivo celular de células endometriais para diversos fins, o que faz com que o modelo esteja relativamente bem estabelecido na literatura.

Apesar de ser modelo *in vitro* acreditamos que, frente à relação entre células estromais e epiteliais definidas no estudo, o cultivo se aproximava do tecido original.

Considerando as possíveis alterações de cada variante do polimorfismo PROGINS, apenas a inserção Alu e a substituição de aminoácidos V660L podem provocar alteração na função do receptor PR. De fato, o processamento do RNA não é influenciado pelos dois SNPs (G3432T no exon 4 ou a C3764T no exon 5) [32].

Estudos com algoritmos matemáticos sobre a estrutura secundária dos transcritos do receptor PR contendo os dois SNPs demonstraram que tanto sua conformação tridimensional, bem como sítios de ligação a complexos de ribonucleoproteínas envolvidas na maturação do RNA não são afetados pela presença dos SNPs. Da mesma forma, a mutação silenciosa (H770H) não provoca alteração na função do receptor PR. Vários autores demonstraram que as inserções Alu podem ter repercussão funcional no que diz respeito a

presenças de ilhas CpG de metilação, transcrição gênica e a ligação com fatores de transcrição e a geração de variantes de splicing devido ao processo de “exonização” da inserção Alu. Portanto, a inserção Alu pode afetar transcrição e a maturação do pré-mRNA, inclusive o mecanismo de *splicing*, enquanto que a substituição de aminoácidos V660L afeta apenas a atividade da proteína [45-47].

Considerando que o polimorfismo PROGINS ocorre em uma frequência maior que 15% em Caucasianos de diferentes origens, a caracterização funcional deste polimorfismo é mandatória para o esclarecimento de seu papel na patogênese da endometriose.

Apesar disso, uma das limitações de nosso estudo é o fato de não termos contemplado amostras contendo o polimorfismo PROGINS em homozigose, pela baixa frequência desse genótipo em nossa população [1].

O presente estudo é o primeiro a analisar o papel *in vitro* do polimorfismo PROGINS presente na região do intron-G do gene codificador do receptor da progesterona, em culturas de células endometriais de mulheres com endometriose.

Nossos resultados mostraram, de forma pioneira, um significativo aumento nos níveis de proliferação e viabilidade celular, maior progressão no ciclo celular e diminuição da apoptose em culturas primárias de endométrio de pacientes portadoras do alelo PROGINS, após estímulo com progesterona, em comparação com células de pacientes não portadoras, com e sem endometriose, sugerindo, fortemente, que a resistência a progesterona esta envolvida na gênese da doença e que a presença do polimorfismo PROGINS pode ser responsável por esta resistência.

Acreditamos que a identificação das diversas alterações provocadas pela presença do polimorfismo PROGINS, em células endometriais de pacientes com endometriose, possa, além de esclarecer melhor alguns aspectos relacionados a etiopatogenia da doença, permitir que novas técnicas diagnósticas e terapêuticas sejam desenvolvidas visando uma melhor qualidade de vida das mulheres com a doença.

1. Houve diferença significativa no índice de proliferação das células endometriais, em cultivo, de mulheres com endometriose, após exposição a estradiol e progesterona, quando comparadas às do grupo controle.
2. Evidenciamos diferença ainda mais significativa, nos índices de proliferação celular, nas células de pacientes com endometriose, que possuíam o polimorfismo PROGINS no gene que codifica o receptor de progesterona, quando comparadas ao grupo de mulheres com endometriose, não portadoras, e as do grupo controle.
3. O grau de apoptose foi significativamente menor nas células endometriais de mulheres com endometriose, após exposição a estradiol e progesterona, quando comparamos com células de pacientes não portadoras do polimorfismo e ao grupo controle.

1. de Carvalho CV, Nogueira-De-Souza NC, Massad-Costa AM, Baracat EC, Girão MJBC, D'Amora P, Schor E, Silva IDCG. Genetic polymorphisms of cytochrome P450c17a (CYP17) and progesterone receptor genes (PROGINS) in the assessment of endometriosis risk. *Gynecol Endocrinol* 2007;23(1):29-33.
2. Wieser F, Schneeberger C, Tong D, Tempfer C, Huber JC, Wenzl R. PROGINS receptor gene polymorphism is associated with endometriosis. *Fertil Steril* 2002;77(2):309-12.
3. Lattuada D, Somigliana E, Vigano P, Candiani M, Pardi G, Di Blasio AM. Genetics of endometriosis: a role for the progesterone receptor gene polymorphism PROGINS? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61:190–4.
4. Junqueira MG, da Silva ID, Nogueira-de-Souza NC, Carvalho CV, Leite DB, Gomes MT, Baracat EC, Lopes LA, Nicolau SM, Goncalves WJ. Progesterone receptor (PROGINS) polymorphism and the risk of endometrial cancer development. *Int J Gynecol Cancer*. 2007;17(1):229-32.
5. Pijnenborg JMA, Romano A, Dam-de Veen GC, Dunselman GAJ, Fischer D-C, Groothuis PG, Kieback DG. Aberrations in the progesterone receptor gene and the risk of recurrent endometrial carcinoma. *J Pathol* 2005;205:597–605.
6. Leite DB, Junqueira MG, de Carvalho CV, Massad-Costa AM, Gonçalves WJ, Nicolau SM, Lopes LA, Baracat EC, da Silva ID. Progesterone receptor (PROGINS) polymorphism and the risk of ovarian cancer. *Steroids*. 2008;73(6):676-80.
7. DeVivo I, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJA. A functional polymorphism in the progesterone receptor gene is associated with an increase in breast cancer risk. *Cancer Res* 2003;63:5236–5238.

8. Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med* 2009, 360(3):268-279.
9. Murphy AA. Clinical aspects of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:1-10.
10. Lepine LA, Hillis SD, Marchbanks PA, Koonin LM, Morrow B, Kieke BA, Wilcox LS. Hysterectomy surveillance--United States, 1980-1993. *MMWR CDC Surveill Summ* 1997;46:1-15.
11. Koninckx PR. The physiopathology of endometriosis: pollution and dioxin. *Gynecol Obstet Invest* 1999;47(Suppl1):47-9.
12. Cramer DW, Missmer SA. The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:11-22.
13. Koninckx PR, Meuleman C, Demeyere S, Lesaffre E, Cornillie FJ. Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. *Fertil Steril* 1991;55:759-65.
14. Rafael F. Valle And John J. Sciarra. Endometriosis: Treatment Strategies. *Ann NY Acad Sci* 2003;997:229–39.
15. Olive DL, Schwartz LB. Endometriosis. *N Engl J Med* 1993;328:1759-69.
16. Gruenwald P. Origin of endometriosis from mesenchyme of the coelomic walls. *Am J Obstet Gynecol* 1942;44:470-74.
17. Donnez J, Nisolle M, Casanas-Roux F, Bassil S, Anaf V. Rectovaginal septum, endometriosis or adenomyosis: laparoscopic management in a series of 231 patients. *Hum Reprod* 1995;10:630-5.

18. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of the endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927;14:422-69.
19. Liu DT, Hitchcock A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93:859-62.
20. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984;64:151-4.
21. Joseph J, Sahn SA. Thoracic endometriosis syndrome: new observations from an analysis of 110 cases. *Am J Med* 1996;100:164-70.
22. Simpson JL, Bischoff FZ. Heritability and molecular genetic studies of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:239-51.
23. Thomas EJ, Lenton EA, Cooke ID. Follicle growth patterns and endocrinological abnormalities in infertile women with minor degrees of endometriosis. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93:852-8.
24. Dmowski WP, Steele RW, Baker GF. Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1981;141:377-
25. Vercellini P, Aimi G, De Giorgi O, Maddalena S, Carinelli S, Crosignani PG. Is cystic ovarian endometriosis an asymmetric disease? *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105:1018-21.
26. Zeyneloglu HB, Arici A, Olive DL. Environmental toxins and endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997;24:307-29.
27. Vinatier D, Cosson M, Dufour P. Is endometriosis an endometrial disease? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;91(2):113-25.

28. Kitawaki J, Kusuki I, Koshiba H, Tsukamoto K, Fushiki S, Honjo H. Detection of aromatase cytochrome P-450 in endometrial biopsy specimens as a diagnostic test for endometriosis. *Fertil Steril* 1999;72(6):1100-6.
29. Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S, Johns A, Meng L, Putman M, Carr B, Bulun SE. Deficient 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Expression in Endometriosis: Failure to Metabolize 17 β -Estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;83:4474-80.
30. Thomas EJ, Lenton EA, Cooke ID. Follicle growth patterns and endocrinological abnormalities in infertile women with minor degrees of endometriosis. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93:852-8.
31. Dmowski WP, Steele RW, Baker GF. Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1981;141:377.
32. Romano A, Lindsey PJ, Fischer DC, Delvoux B, Paulussen AD, Janssen RG, Kieback DG. Two functionally relevant polymorphisms in the human progesterone receptor gene (+331 G/A and progins) and the predisposition for breast and/or ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006;101(2):287-95.
33. Beato M & Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 2000;6:225–36.
34. Li X & O'Malley BW. Unfolding the action of progesterone receptors. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:39261–4.
35. Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in

- human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277:5209–18.
36. Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA Jr, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes and Development* 1995;9:2266–78.
37. Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 2000;289:1751–4.
38. Conneely OM, Mulac-Jericevic B & Lydon JP. Progesterone dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 2003;68:771–8.
39. Rowe SM, Coughlan SJ, McKenna NJ, Garrett E, Kieback DG, Carney DN, Headon DR. Ovarian carcinoma-associated TaqI restriction fragment length polymorphism in intron G of the progesterone receptor gene is due to an Alu sequence insertion. *Cancer Research* 1995;55:2743–5.
40. AgoulNIK IU, Tong X-W, Fischer DC *et al.* A germline variation in the progesterone receptor gene increases transcriptional activity and may modify ovarian cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:6340–9.
41. Schweikert A, Rau T, Berkholz A, Allera A, Daufeldt S, Wildt L. Association of progesterone receptor polymorphism with recurrent abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;113:67–72.
42. Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Ponder BA, Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 1999;8:843–4.

43. Modugno F. Ovarian cancer and polymorphisms in the androgen and progesterone receptor genes: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology* 2004;159:319–35.
44. Romano A, Delvoux B, Fischer D-M, Groothuis P. The PROGINS polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone. *J Mol Endocrinol* 2007;38:331-50.
45. Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 1999;67:183–93.
46. Lev-Maor G, Sorek R, Shomron N, Ast G. The birth of an alternatively spliced exon: 3' splice-site selection in Alu exons. *Science* 2003;300:1288–91.
47. Sorek R, Lev-Maor G, Reznik M, Dagan T, Belinky F, Graur D, Ast G. Minimal conditions for exonization of intronic sequences: 50 splice site formation in alu exons. *Molecular Cell* 2004;14:221–31.



São Paulo, 12 de maio de 2006.

CEP 0571/06

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) PAULO D'AMORA

Co-Investigadores: Eduardo Schor, Ismael DCG Silva (orientador)

Disciplina/Departamento: Ginecologia/Ginecologia Geral da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “**Avaliação da ação da progesterona no ciclo celular de células endometriais, em cultura, de mulheres com endometriose pélvica, com e sem o polimorfismo progin no gene do receptor da progesterona**”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: intervenção diagnóstica.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: risco mínimo, desconforto leve, envolvendo coleta de sangue e biópsia de tecido.

OBJETIVOS: Verificar alterações no receptor de progesterona no tecido endometrial de mulheres com endometriose pélvica.

RESUMO: Serão estudadas células endometriais em cultivo de mulheres com diagnóstico de endometriose realizado por meio de videolaparoscopia. Serão incluídas no estudo, pacientes com idades entre 25 e 40 anos, atendidas no setor de algia pélvica e endometriose do Departamento de Ginecologia da UNIFESP, com indicação de videolaparoscopia como parte da propedêutica do setor para mulheres com suspeita clínica de endometriose. Durante o procedimento, será realizada detalhada inspeção das cavidades abdominal e pélvica, bem como de biópsias de lesões sugestivas de endometriose para diagnóstico histopatológico. As pacientes que não apresentarem alterações pélvicas no exame videolaparoscópico, serão incluídas no grupo controle. No mesmo ato cirúrgico, será colhido material para a genotipagem e para o cultivo celular. Será realizada a genotipagem para os polimorfismos PROGINS. As células endometriais serão cultivadas e realizadas reações imunocitoquímicas, com anticorpos para: pan-citoqueratina, vimentina, CD34. Com o objetivo de analisar a atividade funcional dos receptores de estradiol e progesterona, será realizada a dosagem da taxa de acidificação extracelular das células endometriais utilizando-se o sistema microfisiômetro Cytosensor. Será analisado o efeito de estradiol e medroxi-progesterona na proliferação celular, pela incorporação de timidina tritiada. Será analisada a apoptose nas células cultivadas, por coloração com Hoescht 33342. Análise do ciclo celular será determinada por citometria de fluxo, mensurando-se a quantidade de ácido nucléico.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo visando avaliar a ação da progesterona no ciclo celular de células endometriais em cultura e correlacionar com o polimorfismo progin do gene do receptor da progesterona.



MATERIAL E MÉTODO: Descreve a metodologia empregada, sendo de domínio da equipe envolvida.

TCLE: Adequado.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP.

CRONOGRAMA: 36 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 7/5/2007 e 1/5/2008.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

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. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1- TÍTULO:

“AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA PROGESTERONA NO CICLO CELULAR DE CÉLULAS ENDOMETRIAIS, EM CULTURA, DE MULHERES COM ENDOMETRIOSE PÉLVICA, COM E SEM O POLIMORFISMO PROGINS NO GENE DO RECEPTOR DE PROGESTERONA”

2- OBJETIVO:

“Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo (como paciente do grupo de estudo ou grupo controle) que visa identificar alterações no receptor do hormônio progesterona e conseqüentemente distúrbios na ação deste hormônio nas células uterinas de mulheres com endometriose. Este estudo tem como objetivo verificar se as células do útero e conseqüentemente as células de endometriose respondem de uma maneira diferente ao hormônio progesterona, a progesterona é um hormônio que o ovário secreta após a ovulação e é também usado, na sua forma sintética, para o tratamento da endometriose, uma possível alteração na resposta deste hormônio pelo útero pode implicar em novas formas de tratamento para a endometriose bem como esclarecer alguns aspectos da formação da doença que ainda precisam ser melhores entendidos.”

3- DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS:

Após a anestesia será colocado um espécuro vaginal, semelhante ao usado para coleta do exame de citologia cérvico-vaginal (papanicolau) e será coletado, por meio de uma escova, também similar à usada para coleta do exame de citologia vaginal (papanicolau) um esfregaço de células vaginais para exame do DNA que será enviado para análise da presença ou não de uma alteração no gene receptor da progesterona denominada PROGINS.

Para a obtenção das células do endométrio será realizada a coleta das células uterinas utilizando-se cureta de Novak®. Sendo que, este procedimento só

será realizado após a constatação que não há contra-indicações que são, principalmente: gravidez, infecção uterina e doenças da coagulação sanguínea. E, também, afirma-se que este procedimento só será realizado sob efeito da anestesia na ocasião da videolaparoscopia e pode tratar-se de uma extensão da investigação de interesse científico e não rotineiro. O procedimento rotineiro, isto é, aquele que invariavelmente tem propósito de investigação clínica e terapêutico é a videolaparoscopia .

4- DESCONFORTOS E RISCOS:

O risco da coleta das células endometriais é a possibilidade de perfuração uterina, entretanto, trata-se evento extremamente raro, pois, para a aspiração é utilizado um material delicado e de ponta romba, entretanto, mesmo que ocorra é facilmente identificado e o procedimento é interrompido e inicia-se a videolaparoscopia, não acarretando prejuízo à paciente. Também, esclarece-se que a duração deste procedimento é no máximo de 60 segundos, e, portanto, não acrescenta o risco inerente à anestesia e também não aumenta o desconforto tanto no intra-operatório quanto no pós-operatório.

Os riscos e os desconfortos da videolaparoscopia são aqueles inerentes de um procedimento cirúrgico com a anestesia. Estatisticamente, os principais riscos são: infecção, sangramento e trombo-embolismo venoso. Entretanto, com os cuidados que são rotineiramente utilizados, os riscos de ocorrer uns desses eventos diminuem consideravelmente. Para um melhor esclarecimento, descrevem-se, a seguir, os cuidados principais: visita pré-anestésica, monitorização permanente inclusive com capnografia, anti-sepsia rigorosa, antibiótico-profilaxia, equipe cirúrgica treinada e sob supervisão adequada, profilaxia para a trombose venosa profunda e outros. Considerando-se o desconforto, os principais são: dor no pós-operatório, enjôos e coceiras. Entretanto, com a utilização das medicações sintomáticas estes desconfortos diminuem em intensidade drasticamente.

5- BENEFÍCIOS:

Não há benefício direto para a participante, pois, trata-se de estudo que visa identificar o mecanismo de surgimento da endometriose e somente no final do estudo poder-se-á concluir a presença de algum benefício que servirá a toda a comunidade científica e posteriormente as mulheres portadoras de endometriose.

6- PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS:

Como não se trata de um estudo experimental clínico não há procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar.

7- GARANTIA DE ACESSO:

Estamos a sua disposição para qualquer informação relacionada à pesquisa ou qualquer problema relacionado a ela. Em qualquer etapa do estudo, a paciente terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é **Paulo D'Amora** que pode ser encontrado no Departamento de Ginecologia no endereço: Rua Borges Lagoa, 783, Cj31 3º andar – Vila Clementino CEP 04038-031- telefone 5579-3321.

Caso você tenha alguma dúvida ou consideração com relação aos aspectos éticos da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, tel 5571-1062, Fax 5539-7162 – e-mail: cepunifesp@epm.br.

8- LIBERDADE:

A sua participação no estudo é totalmente voluntária e caso deseje, você poderá se retirar do estudo a qualquer momento, sem nenhuma necessidade de

justificativa e sem nenhum prejuízo em seu tratamento que continuará sendo realizado normalmente.

9- CONFIDENCIALIDADE:

Todas as informações colhidas e as identidades das pacientes serão mantidas em sigilo como informação confidencial.

10- DIREITO DE INFORMAÇÃO:

As pacientes terão direito de serem mantidas atualizadas sobre os resultados parciais desta pesquisa.

11- DESPESAS E COMPENSAÇÕES:

Não existem despesas pessoais para você em qualquer fase do nosso estudo, incluindo exames e consultas. Também não existirá compensação financeira relacionada a sua participação.

12- DANOS PESSOAIS E TRATAMENTO:

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

13- SIGILO:

A nossa equipe de pesquisadores se compromete a utilizar os dados e material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo a pesquisa denominada **AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA PROGESTERONA NO CICLO CELULAR DE CÉLULAS ENDOMETRIAIS, EM CULTURA, DE MULHERES COM ENDOMETRIOSE PÉLVICA, COM E SEM O POLIMORFISMO PROGINS NO GENE DO RECEPTOR DE PROGESTERONA.**

Discuti com o pesquisador responsável pelo estudo **Paulo D'Amora** sobre minha decisão em participar dessa pesquisa. Ficaram claros para mim quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de benefícios que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesse Serviço.

O material coletado e cultivado poderá futuramente ser utilizado para pesquisas que procurem desvendar novos aspectos relacionados a endometriose.

Assinatura da paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura de testemunha

Data ____/____/____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido desta paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____



Relatório de Análise de Segurança no Manuseio de Material Radioativo

Finalidade

O objetivo principal do relatório é estimar a atividade e quantidade de rejeitos radioativos durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa e determinar o tempo necessário de armazenamento com base nas normas vigentes no Brasil.

O pesquisador é solicitado também a informar sobre as condições de trabalho que dispõe e sobre suas providências para tratamento dos rejeitos no IPEN-CNEN-SP, caso seja necessário.

Estas informações serão fundamentais para a elaboração do Plano de Proteção Radiológica exigido pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, sem a aprovação do qual não é permitido a aquisição e o manuseio das substâncias radioativas.

Instruções para preenchimento do Modelo

1.Nome do Projeto (Nome completo do projeto proposto)	Avaliação da ação da progesterona no ciclo celular de células endometriais, em cultura, de mulheres com endometriose pélvica, com e sem o polimorfismo (PROGINS) no gene do receptor da progesterona
1.1 Nome do(s) Ensaio(s) Radioativos	Ensaio de síntese de DNA por incorporação de timidina triciada
2.Nome do Pesquisador (Nome completo da pessoa diretamente envolvida no manuseio dos radioisótopos: Docente; Aluno, outros)	Paulo D'Amora
2.1 Telefone 5579-1534	2.2 E-Mail paulo.toco@epm.br
Dados referentes à aquisição do material radioativo	
3.Nome do Responsável	Dra. Míriam Aparecida Boim
3.1.Número da licença CNEN	AP-0823
4.Nome do laboratório / Setor Deverão ser informados os dados relativos ao local de manuseio do radioisótopo	Disciplina de Nefrologia
4.1.Endereço	Rua Pedro de Toledo, 781, 14º andar
4.2.Centro de custo Deve ser informado o centro de custo do setor ou disciplina ou departamento	020007000



5. Radioisótopo(s) e Fármaco(s) utilizado(s) no(s) ensaio(s) relacionado(s) no Item 1.1		
3H-timidina		
Identificar segundo os exemplos a seguir: ^3H (Trício); ^{125}I (Iodo); ^{32}P (Fósforo); ^{14}C (Carbono); $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Tecnécio); ^{131}I (Iodo), etc.		
6. Dados do frasco "comprado" (adquirido na compra) Relação entre o valor da atividade total registrada no frasco (μCi ; mCi ; MBq ; kBq) e o volume contido no mesmo (μl ; ml).	Atividade 1- 1 mCi	Volume 1 – 1 ml
	2 -	2 -
7. Número de experimentos (Número de experimentos planejados na metodologia)		3
7.1. Período previsto para a execução (meses)	2	
7.2. Data do início do manuseio das substâncias radioativas	Mai / 2006	
8. Atividade por ensaio Valor da atividade (nCi ; μCi ; mCi ; Bq ; kBq ; MBq) da alíquota retirada do frasco "comprado" necessário para o desenvolvimento de 1 experimento para cada radioisótopo.	1- 0,25 μCi	
	2-	
9. Estimativa da sobra radioativa no frasco "comprado" (Valor da atividade do material radioativo não utilizado no projeto)		
9.1 Indicação de seu eventual uso em outros projetos (Indique se a sobra será utilizada em outro projeto)		<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não



10. Caracterização dos rejeitos gerados no projeto em um ensaio

10.1. Rejeitos Sólidos – Radioisótopo ³H-timidina

Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Coluna 4	Coluna 5
Tipos de Materiais	Massa de uma unidade	Unidades por experimento	Atividade	Atividade Específica
1- Ponteira 10 ul	158 mg	1	0,25 uCi	31,65 nCi/g
2- Tubo eppendorf 0,5 ml	1,055 g	1	0,25 uCi	4,74 nCi/g
3- Placa de 12 poços	71,6 g	1	0,25 uCi	0,07 nCi/g
4- Ponteira 1000 ul	673 mg	1	0,25 uCi	7,43 nCi/g
5- Frascos de Cintilação	16 g	35	0,135 nCi	1,69.10 ⁻⁴ nCi/g
6- Ponteira 1000 ul	673 mg	6	0,81 nCi	0,024 nCi/g

10.2. Rejeitos Sólidos – Radioisótopo

Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Coluna 4	Coluna 5
Tipos de Materiais	Massa de uma unidade	Unidades por experimento	Atividade	Atividade Específica

Preencher as colunas conforme abaixo:

- **Coluna 1:** identificar os materiais que serão contaminados com material radioativo. Ex: eppendorf, ponteira, placa, vidro, seringa, luvas etc.
- **Coluna 2:** pesar os materiais identificados na coluna 1 e colocar os valores em grama.
- **Coluna 3:** número utilizado de cada material identificado na coluna 1 em 1 ensaio
- **Coluna 4:** valor da atividade referida no item 8
- **Coluna 5:** valor da atividade da coluna 4 multiplicada por 2% e dividida pela massa do material referida na coluna 2



10.3. Rejeitos Líquidos – Radioisótopo 3H-timidina

Coluna 1 Tipo	Coluna 2 Identificação	Coluna 3 Volume/exp.	Coluna 4 Volume Total	Coluna 5 Contagem (cpm)	Coluna 6 Contagem (dpm)	Coluna 7 Atividade específica
Inorgan.	TCA 5% + NaOH 0,5M	12 ml	36 ml	146.330	219.495	9,89.10 ⁻² uCi/ml
Organ	Líquido cintilação	60 ml	175 ml	533	799,5	3,6.10 ⁻⁴ uCi/ml

10.4. Rejeitos Líquidos – Radioisótopo

Coluna 1 Tipo	Coluna 2 Identificação	Coluna 3 Volume/exp.	Coluna 4 Volume Total	Coluna 5 Contagem (cpm)	Coluna 6 Contagem (dpm)	Coluna 7 Atividade específica

Preencher as colunas conforme abaixo:

- **Coluna 1:** Identificar o tipo de rejeito Ex: orgânico ou inorgânico
- **Coluna 2:** Caracterizar o composto químico associado ao radioisótopo.
Ex: tolueno, fenol, ácidos, águas de lavagem, solução tampão etc.
- **Coluna 3:** Volume dos líquidos identificados na coluna 1 em 1 experimento
- **Coluna 4:** Volume total dos líquidos considerando todos os experimentos
- **Coluna 5:** Valor da contagem (cpm) obtida em contador de cintilação de uma amostra de 1 ml do volume referido na coluna 3 (*)
- **Coluna 6:** Valor da contagem (dpm) obtida em contador de cintilação de uma amostra de 1 ml do volume referido na coluna 3 (*)
- **Coluna 7:** Valor da atividade/ml calculado a partir dos valores da coluna 5 ou 6 e apresentado em $\mu\text{Ci/ml}$

OBS: (*) : 1 dpm = $4,5 \cdot 10^{-7}$ μCi .



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina



Núcleo de
Radioproteção

Na prática é utilizado um fator de correção relativo à eficiência do contador, quando a contagem é obtida em cpm. Sendo assim, para obter o valor em dpm, multiplique este valor por 1,5 (no caso de contagens beta) e 1,3 (no caso de contagens gama).

Rua Botucatu, 659 - Vila Clementino - São Paulo – SP - Brasil
CEP: 04023-900 – telefax: +55 (11).5576-4394
<http://protecaoradiologica.unifesp.br>



11. Limites de Descarte

Rejeito Sólido: 2nCi/g para qualquer radioisótopo

Rejeito Líquido: depende do radioisótopo

Exemplos: $1 \times 10^{-1} \mu\text{Ci/ml}$ (^3H); $5 \times 10^{-4} \mu\text{Ci/ml}$ (^{32}P); $2 \times 10^{-2} \mu\text{Ci/ml}$ (^{14}C); $4 \times 10^{-5} \mu\text{Ci/ml}$ (^{125}I); $2 \times 10^{-12} \mu\text{Ci/ml}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$).

OBS: Os demais valores limites podem ser obtidos na Norma CNEN-NE-6.05 e no Guia Prático Radioproteção no Manuseio de Radioisótopos (ver referências)

12. Gerência de Rejeitos

12.1. Descrever as condições existentes no laboratório quanto ao manuseio, armazenamento das fontes e dos resíduos e proteções existentes. Ex: pia, lixeiras, depósito dos resíduos, anteparos, forração de bancadas, simbologias etc.

O laboratório dispõe de sala específica para manuseio de material radioativo, isolada das demais dependências da Disciplina de Nefrologia. No interior desta sala há uma pia de aço-inox acoplada a uma bancada de mesmo material, um armário utilizado como depósito para resíduos radioativos em processo de decaimento radioativo, um anteparo de acrílico, uma bancada forrada e sinalizada para manipulação de radioativos, monitor de contaminação. O exterior da sala, bem como a bancada e o armário estão sinalizados pelo trifólio. Nesta sala também há um monitor de contaminação portátil, a sala é monitorada por dosímetro ambiental.



12.2. Rejeitos sólidos e líquidos

Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Coluna 4	Coluna 5
Tipo de Material	A	$A_{(limite)}$	Meia Vida	Tempo Armazenamento
1- Ponteira 10 ul	31,65 nCi/g	2 nCi/g	12,3 anos	49 anos
2-Tubo eppendorf 0,5 ml	4,74 nCi/g	2 nCi/g	12,3 anos	15 anos
3- Placa de 12 poços	0,07 nCi/g	2 nCi/g	12,3 anos	descartar
4- Ponteira 1000 ul	7,43 nCi/g	2 nCi/g	12,3 anos	23 anos
5- Frascos de Cintilação	$1,69 \cdot 10^{-4}$ nCi/g	2 nCi/g	12,3 anos	descartar
6- Ponteiras 1000 ul	0,024 nCi/g	2 nCi/g	12,3 anos	descartar
7- solução inorgânica (TCA+NaOH)	$9,89 \cdot 10^{-2}$ uCi/g	$1 \cdot 10^{-1}$ uCi/ml	12,3 anos	descartar
8- solução orgânica (líquido de cintilação)	$3,6 \cdot 10^{-4}$ uCi/g	$1 \cdot 10^{-1}$ uCi/ml	12,3 anos	descartar

Preencher as colunas conforme abaixo:

Coluna 1: identificar os materiais sólidos e líquidos

Coluna 2: atividade específica (A) referida na coluna 5 (sólidos) e coluna 7 (líquidos) das tabelas precedentes

Coluna 3: limite estabelecido pela norma (A_{limite}), conforme descrito no item 11

Coluna 4: valor da meia vida física do radioisótopo ($t_{1/2}$) em dias

Coluna 5: tempo de armazenamento calculado com base na expressão:

$$T = \left(\frac{\ln \frac{A}{A_{limite}}}{\ln 2} \right) \times t_{1/2}$$

A: atividade específica

A_{limite} : atividade específica de limite de descarte,

$t_{1/2}$: tempo de meia vida física do radioisótopo

T: tempo de armazenamento (dias)



12.3. Descrever a metodologia de acondicionamento e de disposição final dos rejeitos.

Visando a redução da quantidade de rejeitos, analise o conjunto dos rejeitos sólidos descritos no item 10 e descreva como pretende fazer a segregação e a disposição final com base no limite de isenção (2nCi/g).

Os rejeitos sólidos, tais como: ponteiras de 10 uL e 1000 uL, tubos eppendorf de 0,5 mL não poderão ser descartados. A ponteira de 10 uL será acondicionada em um frasco, tipo de meio de cultura, separada dos demais rejeitos, pois apresenta atividade específica muito alta. Este frasco deverá ser sinalizado e identificado com os dados do rejeito. Os outros rejeitos serão acondicionados juntos, também, sinalizado e identificado com o valor da atividade específica da ponte de 1000 uL.

As placas de 12 poços e as outras ponteiras de 1000 uL serão acondicionados em saco plástico, que será identificado pela etiqueta amarela, com os dados da atividade específica da placa de 12 poços. Então, serão descartados pelos técnicos do Núcleo de Proteção Radiológica. Os frascos de cintilação serão lavados e reutilizados.

Os rejeitos líquidos serão segregados em rejeito orgânico e inorgânico. Estes serão descartados após o término do experimento, após a caracterização de uma alíquota, para confirmar que estão abaixo do limite de descarte. Serão descartados pelo Núcleo de Proteção Radiológica.

12.4. Previsão orçamentária para tratamento dos rejeitos de meia vida longa.

No caso do tempo de armazenamento ser superior a 2 anos há necessidade de tratamento dos rejeitos no IPEN-CNEN-SP. O custo é dependente do tipo de radioisótopo, massa ou volume e deverá ser orçado.

As despesas com o tratamento dos rejeitos devem ser consideradas quando for solicitado auxílio aos órgãos de fomento.

Será solicitado análise orçamentária ao IPEN-CNEN para tratamento posterior dos rejeitos que apresentam atividade específica acima do limite de eliminação.

O DESCARTE FINAL DOS REJEITOS, SÓLIDOS E LÍQUIDOS, DEVEM SER AUTORIZADOS PELO NÚCLEO DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA.

Referências

[1] Associação Brasileira de Normas Técnicas ABNT. Normas Brasileiras Regulamentadoras NBR 9.191. Sacos plásticos para acondicionamento-Especificação.

[2] Comissão Nacional de Energia Nuclear. Gerência de Rejeitos Radioativos em Instalações Radiativas. CNEN-NE-6.05. Rio de Janeiro, 1985.

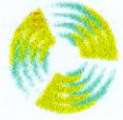
[3] Comissão Nacional de Energia Nuclear. Programa de Gerência de Rejeitos Radioativos em Pesquisa PROGER 1ª Edição. Rio de Janeiro - Brasil, 1998.

[4] Conselho Nacional de Meio Ambiente [Resolução CONAMA nº 5]. Gerência de Resíduo do Sistema de Saúde. Brasil, 3 de dezembro de 1986.

[5] Medeiros RB, Mattos MFSS, Godinho RO. Benefícios da utilização de líquidos de cintilação biodegradáveis nas aplicações laboratoriais. Alasbimn Journal 2001; 4 (14).



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina



Núcleo de
Radioproteção

6] Medeiros RB, Mattos MFSS. Administración de deyecciones radioativas de média vida larga generados en las actividades de pesquisa. Física Médica 2001; vol 2, Supl 1 [Resumo de Congresso].

7] Medeiros RB. Radioproteção no Manuseio de Radioisótopos - guia prático. São Paulo - Brasil: CEDESS / UNIFESP, 1998.
<http://www.cnen.gov.br>
<http://protecaoradiologica.unifesp.br>

[Handwritten signature]

Assinatura do pesquisador

[Handwritten signature]
[Handwritten signature]

Assinatura do orientador

Parecer no núcleo de proteção radiológica

- APROVADO
- PENDENTE

Recomendações:

NÚCLEO DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA
8/4/06.

[Handwritten initials MF]

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)