



**LUCIANA PIETRO**

**"EXPRESSÃO DOS FATORES LIF (FATOR INIBITÓRIO  
DE LEUCEMIA), IL-6 (INTERLEUCINA-6), STAT-3  
(ATIVADOR DE TRANSCRIÇÃO-3) E TELOMERASE EM  
CORIOCARCINOMAS."**

**CAMPINAS**

**2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**LUCIANA PIETRO**

**"EXPRESSÃO DOS FATORES LIF (FATOR INIBITÓRIO  
DE LEUCEMIA), IL-6 (INTERLEUCINA-6), STAT-3  
(ATIVADOR DE TRANSCRIÇÃO-3) E TELOMERASE EM  
CORIOCARCINOMAS."**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> LILIANA APARECIDA LUCCI DE ANGELO ANDRADE**

**CO-ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> FÁTIMA APARECIDA BOTTCHER LUIZ**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Doutora em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA LUCIANA PIETRO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. LILIANA APARECIDA LUCCI DE ANGELO ANDRADE.

-----  
Assinatura do Orientador

**CAMPINAS**

**2013**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P618e Pietro, Luciana, 1981-  
Expressão dos fatores LIF (Fator Inibitório de Leucemia), IL-6 (Interleucina-6), STAT-3 (Ativador de Transcrição-3) e telomerase em coriocarcinomas / Luciana Pietro. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Liliana Aparecida Lucci de Angelo Andrade.  
Coorientador: Fatima Aparecida Böttcher-Luiz.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Trofoblastos. 2. Coriocarcinoma. 3. Inflamação. 4. Interleucina-6. 5. Fator de transcrição STAT3. 6. Fator inibidor de leucemia. I. Andrade, Liliana Aparecida Lucci de Angelo, 1951-. II. Böttcher-Luiz, Fátima, 1957-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Expression of LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-6 (Interleukin-6), STAT-3 (Activator of Transcription-3) and telomerase in choriocarcinomas

**Palavras-chave em inglês:**

Trophoblasts  
Choriocarcinoma  
Inflammation  
Interleukin-6  
STAT3 transcription factor  
Leukemia inhibitory factor

**Área de concentração:** Ciências Biomédicas

**Titulação:** Doutora em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Liliana Aparecida Lucci de Angelo Andrade [Orientador]  
Sara Maria Zago Gomes  
Gustavo Rubino de Azevedo Focchi  
Maria Leticia Cintra  
Andre Almeida Schenka

**Data de defesa:** 11-12-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

---

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**  
**LUCIANA PIETRO**

---

Orientador (a) PROF(A). DR(A). LILIANA APARECIDA LUCCI DE ANGELO ANDRADE

Coorientador (a) PROF(A). DR(A). FÁTIMA APARECIDA BOTTCHER LUIZ

---

---

**MEMBROS:**

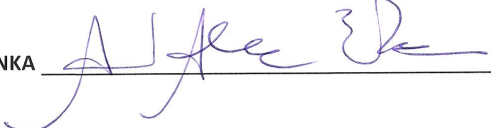
---

1. PROF(A). DR(A). LILIANA APARECIDA LUCCI DE ANGELO ANDRADE 

2. PROF(A). DR(A). SARA MARIA ZAGO GOMES 

3. PROF(A). DR(A). GUSTAVO RUBINO DE AZEVEDO FOCCHI 

4. PROF(A).DR(A). MARIA LETICIA CINTRA 

5. PROF(A).DR(A). ANDRE ALMEIDA SCHENKA 

---

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas

---

**Data: 11 de dezembro de 2013**

---

*A DEUS*

Acima de tudo,  
tenho certeza de que  
também guiou meus  
passos neste trabalho.  
Por ser essencial em minha vida,  
autor de meu destino,  
meu guia,  
socorro presente  
na hora da angústia

## *À MINHA FAMÍLIA*

Ao meu pai Antonio  
pelo apoio, carinho e preocupação,  
oferecendo-me a oportunidade  
de crescer profissionalmente.

À minha mãe Vera (†)  
que, mesmo distante,  
sei que me acompanhou  
durante toda esta jornada,  
olhando por mim.

Ao meu marido Juan,  
pela paciência e dedicação  
nas horas em que mais precisei.

*À Dra. Liliana Andrade  
e Dra. Fátima Böttcher*

Em especial, à minha orientadora  
Profa. Dra. Liliana Andrade e  
minha co-orientadora Profa.  
Dra. Fátima Böttcher, pela confiança  
e credibilidade em mim depositada,  
que acreditaram em mim e em me guiaram  
na conquista desse sonho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Prof. Dr. Lício Augusto Velloso e à estudante e técnica Josiane Morari pela excelente assistência técnica na análise de Western Blotting e Real-time PCR no Laboratório Médico de Fisiopatologia.

Ao Dr. Marcelo Nomura do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, pela assistência com a coleta de placenta humanas.

Ao Dr. Antonio Fazano e Josianne Nascimento pelo acesso à excelente estrutura de seu laboratório para a realização de culturas de células.

Ao Dr. Athanase Billis pela assistência nas análises estatísticas.

Aos técnicos do Laboratório de Imunoistoquímica, Ana Claudia Sparapani Piazza, Luzia Aparecida Magalhães Alvez, Arethusa de Souza e Luis Felipe Billis pelo excelente auxílio nas técnicas de imunoistoquímica.



## **RESUMO**

A invasão do endométrio pelo trofoblasto extraviloso é fundamental no desenvolvimento do feto e da placenta, processo este controlado por fatores ligados à atividade imunológica e hormonal que, quando alterada, pode resultar em interrupção da gestação e/ou geração das chamadas doenças trofoblásticas gestacionais. Em algumas situações, pode haver evolução para o coriocarcinoma, neoplasia maligna do trofoblasto, em que há evidências da atuação das moléculas ligadas ao processo de fusão celular e inflamação. Porém, os estudos neste tema são incipientes e inconclusivos. Considerando essas informações, o **objetivo** deste trabalho é estudar de forma comparativa a expressão das citocinas LIF, IL-6 e do ativador de transcrição STAT-3, além da telomerase, em material de aborto, de placenta normal a termo e de coriocarcinoma. **Métodos:** a expressão destas moléculas foi avaliada pelos métodos: imunohistoquímica (IHQ), imunofluorescência (IF), Western Blotting (WB) e Real-Time PCR (RT-PCR), em amostras de material de aborto, placenta normal a termo e coriocarcinoma (N=12 cada um). Os ensaios de WB e Real-Time PCR empregaram material a fresco de placenta normal a termo e seu cultivo celular e cultura da linhagem BeWo. **Resultados:** no material de aborto, as reações de IHQs evidenciaram expressão moderada de IL-6 em 58,4% dos casos e intensa de STAT-3 em 33,3%. Na placenta normal, observou-se intensa marcação de IL-6 em 50% e de STAT-3 em 16,7% dos casos, enquanto que, no coriocarcinoma, houve expressão intensa de IL-6 em 50% e de STAT-3 em 75% dos casos. Por outro lado, as reações para LIF tiveram expressão nula em todos os três grupos. Pelo WB houve expressão proteica de IL-6 apenas no material fresco de placenta normal e ausência de expressão na sua cultura primária e na linhagem BeWo; LIF não foi expresso em todos os grupos estudados. STAT-3 foi detectado no citoplasma em todos os grupos, entretanto, a expressão nuclear da STAT-3 fosforilada (pSTAT-3) não foi observada na IF e nem pelo WB. Na análise gênica pelo RT-PCR houve forte expressão de IL-6 e STAT-3 no material fresco de placenta normal e expressão muito fraca na cultura primária de placenta normal e na linhagem BeWo; a expressão de LIF foi muito fraca em todos os grupos. Apenas a linhagem BeWo demonstrou forte expressão gênica da telomerase, contrastando com a completa falta de expressão no material fresco de placenta normal e em sua cultura primária. **Conclusão:** A intensa expressão IHQ de IL-6 e STAT-3 no coriocarcinoma indica a atuação de ambas na carcinogênese. A expressão proteica de IL-6 no material fresco de placenta normal e sua ausência no material de cultura primária e na linhagem BeWo pode ser ocasionado pelo

contato célula-a-célula nas culturas aderentes, inibindo o crescimento celular e, conseqüentemente, as vias de sinalização. A falta de expressão da pSTAT-3 tanto na IF como por WB demonstra que a via JAK-STAT está sendo desativada. A ausência de expressão de LIF, em todos os métodos estudados, sugere que esta citocina poderia estar sendo inibida por meio de proteínas SOCS3 ou, atuando, de modo indireto, na proliferação celular do coriocarcinoma. O aumento da atividade da telomerase nas células BeWo reforça sua relação com o fenótipo maligno e a aponta como um bom marcador para progressão da doença.

**Palavras chave:** coriocarcinoma, trofoblasto, inflamação, IL-6, LIF, STAT-3

## **ABSTRACT**

The invasion of the endometrium by extravillous trophoblast is a fundamental process in the growth of the fetus and placenta. The process is controlled by factors related to the immune and hormonal activity that, when changed, may result in termination of pregnancy and development of so-called gestational trophoblastic diseases. In some cases, changes can result in malignancy, in which some molecules play a role in cell fusion process and inflammation, although studies in this area are inconclusive. Considering this information, the study had the aim of investigating the expression of cytokines LIF, IL-6, STAT-3 and the function of telomerase to understand their participation in abortion, in normal at term placenta and choriocarcinoma. **Methods:** The expression of the molecules was assessed by immunohistochemical assay (IHC), immunofluorescence (IF), Western Blotting (WB) and Real-Time PCR (RT - PCR) using fixed material from biopsies of abortions, normal at term placentas and choriocarcinoma along with fresh tissue of normal at term placenta and their primary culture and BeWo cell line. Paraffin embedded material used in IHC and IF assays were obtained from the Department of Pathology files. Tests of WB and Real-Time PCR employed fresh material, obtained from cell cultures of normal at term placenta and the BeWo line. **Results:** IHC reactions to abortion biopsies showed moderate staining for IL-6 in 58.4% of cases and intense for STAT-3 in 33.3 % of cases. In biopsies of normal placenta, there was intense reaction for IL-6 in 50% of cases, intense for STAT-3 in 16.7%; choriocarcinoma showed intense staining for IL-6 in 50% of cases and also for STAT-3 in 75% of cases. On the other hand, LIF expression was missing in all three groups. WB analyses showed IL-6 protein in fresh material from normal placentas, but no expression in placenta primary cultures and BeWo line. LIF was absent in all groups. Cytoplasmic STAT-3 was observed in all groups, while the nuclear expression of phosphorylated STAT-3 was absent. On gene analyses a strong expression of IL-6 and STAT-3 was observed from fresh normal placenta, but very weak expression in primary cultures of normal placenta and BeWo cell line. LIF expression was very weak in all groups. In regard to the gene expression of telomerase, it was strong in the BeWo line which contrasted with its complete lack of expression in fresh normal placenta and its primary culture. **Conclusion:** The high expression of IL-6 and STAT-3 in biopsies of choriocarcinoma indicates the role of both in tumor progression. Regarding protein expression, the presence of IL-6 in the material from fresh normal placenta, and its absence in primary culture and BeWo line may be caused by the cell-to-cell contact cultures by

inhibiting cell growth and thus signaling pathways. However, the lack of expression of phosphorylated STAT-3 whether through IF or WB shows that its JAK-STAT pathway is inhibited. Lack of expression of the LIF suggests that it might be involved indirectly in choriocarcinoma cell proliferation or be inhibited by SOCS3 protein. Moreover, the increased telomerase activity of BeWo cells enhances their relation to the malignant phenotype and indicates a good marker for disease progression.

**Key-words:** Choriocarcinoma, Trophoblast, Inflammation, IL-6, STAT-3, LIF.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ATCC - *American Type Culture Collection, USA* - Banco de células  
ATV - Associação tripsina-verseno  
BSA - *Bovine serum albumine*, soroalbumina bovina  
BeWo - Linhagem celular imortalizada de coriocarcinoma  
CT - Citotrofoblasto  
DAB - Diaminobenzidina  
DMSO - Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo  
DTG - Doenças trofoblásticas gestacionais  
DTT - Ditioneitol  
EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EPM - Erro padrão de medida  
BSF-2 - B-cell stimulating factor - Fator de diferenciação de linfócitos B  
GAPD - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
gp130 - Glycoprotein 130  
HE - Hematoxilina e eosina  
hCG - Hormônio gonadotrofina coriônica humana  
hTELOMERASE - Enzima catalítica da telomerase  
IF - Imunofluorescência  
IHQ – Imunoistoquímica  
IL-6 - Interleucina 6  
JAK - Janus Kinases  
LIF - Fator Inibitório de Leucemia  
M - Molaridade  
MEC - Matriz extracelular  
MMP - Matriz de Metaloproteinases  
mg - Miligramas  
mL - Mililitros  
PBS-T - tampão fosfato com Tween  
PMSF - Phenylmethanesulfonyl fluoride or phenylmethylsulfonyl fluoride  
hTERC - RNA ribossomal da telomerase

RT-PCR - PCR em tempo real

SDS - Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE - Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SFB - Soro Fetal Bovino

SOCs - Suppressors of cytokine signalling

ST - Sinciciotrofoblasto

STAT-3 - Signal transducer and activator of transcription 3 (transmissor de sinal e ativador de Transcrição-3)

TI - Trofoblasto Intermediário

TIMP - Inibidores de metaloproteinases

TRIS-EDTA - TRIS-hidroximetil aminometano

TBS - tampão Tris-salina

$\mu\text{m}$  - micrômetro

WB - Western Blotting



**Tabela 1:** Anticorpos primários e secundários empregados neste estudo – descrição, diluição e estruturas marcadas

**Tabela 2.** Imunodeteccção de IL-6, LIF, STAT-3 e pSTAT-3 em Material de abortos

**Tabela 3.** Imunodeteccção de IL-6, LIF, STAT-3 e pSTAT-3 em Material de placenta normal

**Tabela 4.** Imunodeteccção de IL-6, LIF, STAT-3 e pSTAT-3 em Material de coriocarcinoma

**Tabela 5.** Expressão Proteica de IL-6, LIF, STAT-3 e Telomerare em materiais *frescos* de placenta normal, sua cultura primária e linhagem celular BeWo (RT-PCR)

**Tabela 6.** Expressão Gênica de IL-6, LIF, STAT-3 e Telomerare em materiais *frescos* de placenta normal, sua cultura primária e linhagem celular BeWo (RT-PCR)

**Figura 1.** Esquema proposto da janela de implantação e o papel do LIF na interação materno-fetal.

**Figura 2.** Via de sinalização de LIF.

**Figura 3.** Via de sinalização de IL-6.

**Figura 4.** Via de sinalização de STAT-3.

**Figura 5.** Cortes histológicos em HE (A) e imunodeteção em Material de abortos para IL-6 (B-C), LIF (E-F), STAT-3 (H-I) e imunofluorescência para STAT-3 fosforilada (pSTAT-3) (K-L).

**Figura 6.** Cortes histológicos em HE (A) e imunodeteção em Material de placenta normal a termo para IL-6 (B-C), LIF (E-F), STAT-3 (H-I) e imunofluorescência para STAT-3 fosforilada (K-L).

**Figura 7.** Cortes histológicos em HE (A) e imunodeteção em Material de coriocarcinoma de IL-6 (B-C), LIF (E-F) e STAT-3 (H-I) e imunofluorescência para STAT-3 fosforilada (K-L).

**Figura 8.** Imunodeteção de IL-6, LIF, STAT-3 e pSTAT-3 em Material de abortos

**Figura 9.** Imunodeteção de IL-6, LIF, STAT-3 e pSTAT-3 em Material de placenta normal a termo

**Figura 10.** Imunodeteção de IL-6, LIF, STAT-3 e pSTAT-3 em Material de coriocarcinomas

**Figura 11.** Western blotting para identificação proteica

**Figura 12.** Expressão Proteica de  $\beta$  actina, IL-6, LIF, STAT-3 e STAT-3 fosforilada (pSTAT-3) em materiais a frescos de placenta normal, sua cultura primária e linhagem celular BeWo (Western Blotting).

**Figura 13.** Expressão Gênica de IL-6, LIF, STAT-3 e Telomerase em tecido fresco de placenta normal, sua cultura primária e linhagem celular BeWo (Real time PCR).

**Figura 14.** Via de sinalização JAK-STAT

<b>Resumo .....</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>xiv</b>
<b>Lista de Tabelas .....</b>	<b>xvi</b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>xvii</b>
<b>I. Introdução .....</b>	<b>21</b>
<b>II. Objetivos.....</b>	<b>23</b>
<b>III. Revisão da Literatura.....</b>	<b>25</b>
<b>IV. Justificativa.....</b>	<b>38</b>
<b>V. Materiais e Métodos .....</b>	<b>40</b>
1. Desenho do Estudo .....	41
2. Constituição da amostra.....	41
3. Técnicas	
3.1 Imunoistoquímica (IHQ) .....	43
3.2 Imunofluorescência (IF) .....	44
3.3 Imunoprecipitação e Western Blotting (WB).....	45
3.4 Extração de RNA.....	47
3.5 Real-Time PCR.....	48
3.6 Validação da Eficiência dos genes de Interesse .....	48
3.7 Análise Estatística.....	49
<b>VI. Aspectos Éticos .....</b>	<b>51</b>
<b>VII. Resultados .....</b>	<b>53</b>
6.1. Imunodeteção em Material de aborto.....	54
6.2. Imunodeteção em Material de placenta normal .....	56
6.3. Imunodeteção em Material de coriocarcinoma .....	58
6.4. Análise Proteica por Western Blotting .....	61
6.5. Análise Gênica por Real-Time PCR .....	63
<b>VIII. Discussão .....</b>	<b>65</b>
7.1. Morfologia da Placenta.....	66
7.2. Citocina .....	67
7.2.1. Papel da IL-6 .....	67
7.2.2. Papel da LIF.....	70
7.2.3. Papel da STAT-3.....	73

7.4 Telomerase e Real-Time PCR .....	76
<b>IX. Conclusão .....</b>	<b>77</b>
<b>X. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>79</b>

## **I. INTRODUÇÃO**

O estabelecimento de gravidez começa com a implantação de blastocistos no endométrio e depende da capacidade das células trofoblásticas interagirem com a parede uterina, estroma do endométrio e dos vasos sanguíneos. Além disso, o útero sofre estimulação por meio de moléculas reguladoras que desempenham um papel funcional na preparação da mucosa endometrial para a implantação do embrião e adesão do trofoblasto.

Sabe-se que a implantação do embrião tem muitas semelhanças com a carcinogênese porque em ambos, trofoblasto e células tumorais, existe a capacidade de invasão dos tecidos. Embora esta propriedade ocorra nas células trofoblásticas sob condições fisiológicas, as mudanças no processo podem resultar em doenças relacionadas com a gestação. Muitos dos fatores de sinalização que são operados ou produzidos por células trofoblásticas podem desencadear vias de sinalização por meio de vias Janus quinases (JAK) e ativadores de transmissão de sinal de transcrição via JAK/STAT.

Durante a invasão tumoral, mediadores de sinalização são ativadas via STAT-3, atuando no crescimento e organizando a motilidade de muitos tipos de tumores e células pluripotentes. Além disso, STAT-3 está envolvida com a regulação da transcrição de proteases que são de importância crucial para crescimento de células invasoras.

LIF e IL-6 são as citocinas também relacionados com o processo neoplásico. De acordo com Nachtigall, LIF atua na adesão de células trofoblásticas e de elementos extracelulares da matriz extracelular (ECM), diminuindo a expressão das integrinas e estimulando a produção de inibidores de metaloproteinases (TIMP). É postulado que LIF também regula a implantação embrionária por modulação direta da diferenciação do trofoblasto. Além disso, LIF pode mediar interações entre leucócitos e células trofoblásticas no endométrio e também está ligada a angiogênese em vilos placentários.

Entre as doenças gestacionais trofoblásticas (GTD), o coriocarcinoma representa uma lesão neoplásica maligna com mudanças que ocorrem durante vários estágios de diferenciação do trofoblasto e diante disso, este trabalho avaliou a participação das citocinas IL-6 e LIF e o ativador de transcrição, STAT -3, em abortos, placentas normais a termo e em coriocarcinomas

## **II. OBJETIVOS**



**Geral:** Verificar a expressão das citocinas IL-6 e LIF, da telomerase e do fator de ativação e transmissão de sinal STAT-3, em células provenientes de abortos, placenta normal e coriocarcinomas.

**Específicos:**

1. Avaliar e comparar a expressão imunoistoquímica de IL-6, LIF, STAT-3 e STAT-3 fosforilada em material fixado de abortos, placentas normais a termo e coriocarcinomas humanos.
2. Avaliar e comparar a expressão proteica das moléculas IL-6, LIF, STAT-3 e STAT-3 fosforilada em material *fresco* de placenta normal a termo, de sua cultura primária e da linhagem tumoral BeWo.
3. Avaliar e comparar a expressão gênica das moléculas IL-6, LIF, STAT-3 e telomerase em material *fresco* de placenta normal a termo e sua respectiva cultura primária e de células da linhagem BeWo.

### **III. REVISÃO DA LITERATURA**

O estabelecimento da gestação inicia-se com a implantação do blastocisto no endométrio e, decisivamente, depende da capacidade das células trofoblásticas interagirem com a parede uterina e, subsequentemente, com o estroma endometrial e os vasos sanguíneos. Esta interação ocorre através de vias parácrinas e autócrinas, induzidas pelo útero, frente ao estímulo de moléculas modulatórias, entre as quais hormônios e peptídeos. As modificações criam um ambiente favorável para o recebimento do blastocisto, numa série de eventos denominada decidualização (LUNGHI *et al.*, 2007).

A decidualização é um processo independente da presença do blastocisto na cavidade uterina e se inicia no final da fase secretória do ciclo menstrual, passando por mudanças significativas nas células do estroma endometrial, de vasos sanguíneos e das células do sistema imune local (SALAMONSEN *et al.*, 2003). Paralelamente, as alterações também servem para sustentar o início de implantação do embrião e restringir a invasão do trofoblasto no útero (CHENG *et al.*, 2001).

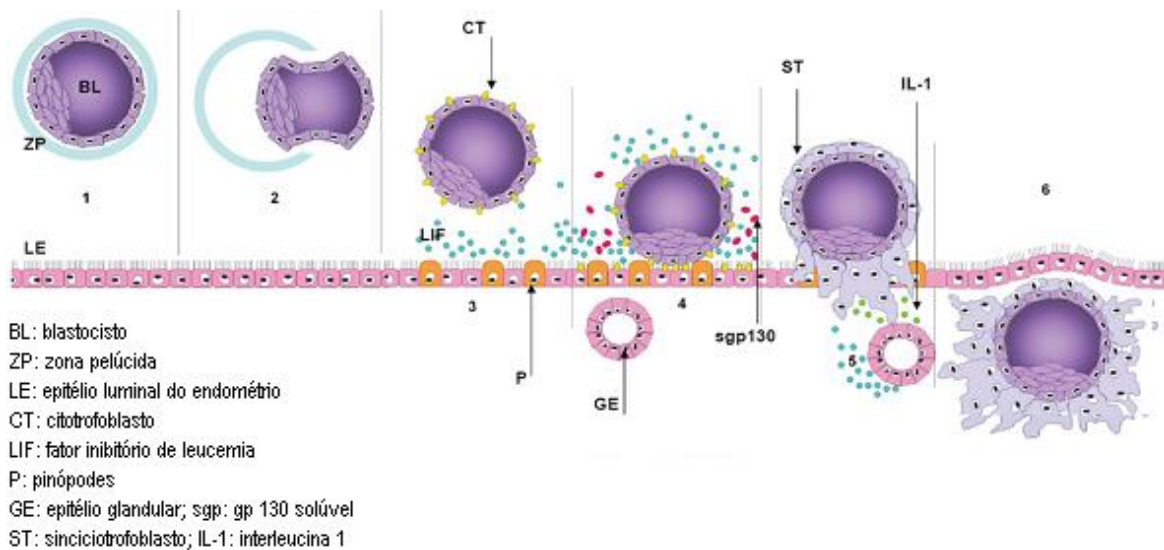
O endométrio humano é receptivo à implantação do embrião somente durante um pequeno período da fase lútea, que se inicia aproximadamente sete dias após a ovulação e finaliza não mais que dois dias após. Neste período, chamado de *nidação* ou *janela de implantação*, ocorre a máxima receptividade do epitélio ao embrião (DUC-GOIRAN *et al.*, 1999) e a liberação dos hormônios estrógeno e progesterona ovarianos que, por sua vez, participam da regulação de moléculas de adesão e de fatores de transcrição (CHENG *et al.*, 2001).

Durante a implantação, o blastocisto penetra o epitélio superficial que reveste a cavidade endometrial, atravessando a lâmina basal e alcançando o estroma endometrial. Forma-se o sinciciotrofoblasto a partir do citotrofoblasto, ocorre aumento da vascularização local e, por último, se estabelece a circulação útero-placentária. Nesta fase, o citotrofoblasto forma os vilos de ancoragem que proliferam para fora da membrana basal e formam as colunas celulares nas quais as células trofoblásticas intermediárias migram para a decídua e o citotrofoblasto invade a parede das artérias espiraladas maternas, originando as células trofoblásticas endovasculares. Este processo permite que as células do trofoblasto entrem em contato direto com o sangue materno, estabelecendo a circulação útero-placentária (NORWITZ *et al.*, 2001).

A aposição do blastocisto é iniciada pelas projeções apicais da membrana celular, chamadas pinópodes, que são organelas dependentes de progesterona que facilitam a

aderência do blastocisto à superfície do endométrio (CAVAGNA e MANTESE, 2003). Obtida a aderência estável para implantação, o polo embriônico se orienta em direção ao epitélio, onde moléculas de adesão celular (cateninas, integrinas, selectinas e tropininas) permitirão a tração e o movimento de células ou a transmissão de sinais entre a matriz extracelular e as células (APLIN e KIMBER, 2004). Além das moléculas de adesão celular, citocinas e fatores de crescimento também são produzidos, assim como proteases capazes de degradar a membrana basal, principalmente metaloproteinases-2 e -9 (MMP-2 e MMP-9) (TAPIA, *et al.*, 2008).

Durante o último estágio, denominado de invasão ou nidação, ocorre o achatamento celular e a penetração do sinciciotrofoblasto no endométrio, seguido pela infiltração de células citotrofoblásticas mononucleares e pela invasão da terceira camada (do miométrio) e da vasculatura uterina (STAUM-RAM *et al.*, 2004) (**Figura 1**).



**Fig. 1.** Esquema proposto da janela de implantação e o papel do LIF na interação materno-fetal. (1) Representação esquemática do blastocisto no útero pela zona pelúcida: sinalização parácrina provavelmente atrai o blastocisto para o sítio de implantação e sincroniza e orquestra os próximos passos, tais como (2) a perda da zona pelúcida. (3) Representação gradual da aposição do blastocisto no endométrio no início do período da implantação da janela, delimitada por pinópodes e LIF, que é maximamente expresso pelo endométrio no momento da implantação e o blastocisto expressa o LIF receptor. Em (4), o blastocisto adere ao endométrio e, então produz LIF, ao passo que, no endométrio, a produção de gp130 e receptor de LIF aumentam. A adesão induz as células trofoblásticas a se diferenciarem em citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto (5) o que resulta na invasão do epitélio luminal do endométrio pelo sinciciotrofoblasto. Em seguida, o blastocisto começa a secretar citocinas como a IL-1, que, por sua vez, estimula a expressão de LIF no endométrio. Em (6), a implantação está concluída, a janela do implante já foi encerrada. Assim, propõe-se que o embrião e o endométrio comunicam-se ativamente através da secreção de citocinas e outros, a fim de promover a completa implantação do blastocisto (Modificado de FITZGERALD *et al.*, 2008).

### ***Citocinas e ativadores de transcrição durante o processo de implantação***

As citocinas são importantes mediadores intercelulares, responsáveis pela regulação da sobrevivência, crescimento, migração, diferenciação e funções efetoras nas células. Frequentemente afetam a ação de outras citocinas de modo sinérgico ou antagonista. Além disso, exercem ações que podem ser auto-, para- ou endócrina, via receptores de superfície celular específicos em suas células alvo (HEINRICH *et al.*, 1998). Entre as várias citocinas existentes estão o fator inibitório de leucemia (LIF) e a interleucina-6 (IL-6), cujas funções são discutidas abaixo.

### ➔ *Fator Inibitório de Leucemia (LIF)*

O fator inibitório de leucemia (LIF) é uma glicoproteína pleiotrófica que pertence à família de ligantes que incluem interleucina-6 (IL-6), IL-11, oncostatina M, fator neurotrófico ciliar (CNTF) e cardiotropina. Possui um importante papel na implantação e placentação de muitas espécies e é secretado em altas concentrações no endométrio, predominantemente na fase secretória do ciclo menstrual normal, e na decídua (CAVAGNA e MANTESE, 2003).

LIF atua nas células através da ligação ao receptor LIF heterodimérico constituído pelas duas proteínas transmembrana, gp 130 e receptor LIF  $\alpha$  (LIF-R $\alpha$ ). Com esta ligação, ocorre dimerização do receptor e recrutamento de receptores tirosina quinases JAK 1 ou 2, que fosforizam os domínios citoplasmáticos dos receptores. Esta cascata de sinalização resulta no recrutamento e na fosforilação de transdutores e ativadores de sinalização (STAT) pelas proteínas JAK. Com isso, ocorre a dimerização e a translocação para o núcleo onde atuam regulando a expressão gênica (CHENG *et al.*, 2001) (**Figura 2**).

A ligação do LIF ao seu receptor é de baixa afinidade, que causa associação do complexo receptor/ligante com outra proteína de membrana, a gp130, resultando na transmissão de sinal via JAK/STAT-3 (WHITE *et al.*, 2007) que, por sua vez, estimula a formação de pinópodes para implantação do blastocisto e a expressão de proteases e seus inibidores, com importante papel no processo de invasão (CORVENUS *et al.*, 2003).

Evidências diretas do papel do LIF no processo de implantação surgem de observações de camundongos fêmeas com ausência de um gene LIF funcional. Embora viáveis, camundongos fêmeas e com genótipo nulo para LIF (LIF<sup>-/-</sup>) são incapazes de sustentar a implantação (SHARKEY *et al.*, 1999). Segundo Li *et al.* (1995), embriões

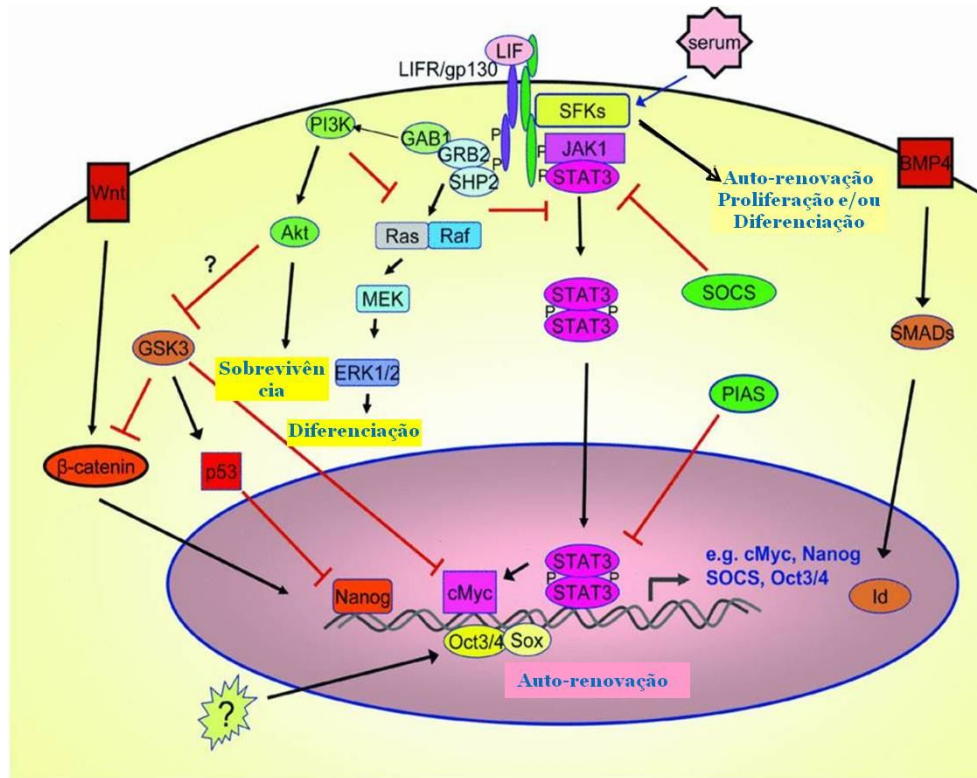
homozigotos para a falta do receptor de LIF (LIF-R<sup>-/-</sup>) chegam a implantar na parede uterina, mas morrem dentro de 24 h, em razão das numerosas alterações morfo-funcionais das placentas (FITZGERALD, *et al.* 2008).

As mesmas evidências acima foram observadas em mulheres inférteis, sugerindo que a expressão de LIF ou da IL-6 no endométrio pode estar associada com a infertilidade humana feminina (SMITH *et al.*, 1998). Laird e colaboradores (1997) observaram que as concentrações plasmáticas de LIF são significativamente menores em mulheres com infertilidade idiopática, quando comparadas às concentrações em mulheres férteis.

Segundo Tapia *et al.* (2008), LIF atua estimulando a adesão de células do trofoblasto extra-viloso a elementos da matriz extracelular (MEC), diminuindo a expressão de integrinas e estimulando a produção de inibidores de metaloproteinases (TIMP). Postula-se ainda que LIF regula a implantação embrionária pela modulação direta da diferenciação do trofoblasto (NACHTIGALL *et al.*, 1996). Sharkey *et al.* (1999) sugeriram que o LIF pode mediar interações entre leucócitos endometriais e o trofoblasto, além de controlar a angiogênese no vilo placentário.

Em humanos, a expressão de LIF não depende da presença do trofoblasto e sua secreção parece ser regulada por outras citocinas presentes no ambiente uterino, assim como pelos hormônios sexuais maternos (UZUMEU *et al.*, 1998).

Além das funções relacionadas aos processos de implantação e placentação, LIF é responsável ainda pela diminuição da secreção de metaloproteinases e pelo aumento da secreção de fibronectina fetal, glicoproteína responsável pelo achatamento do trofoblasto no endométrio, durante o primeiro trimestre gestacional (NACHTIGALL *et al.*, 1996). Estes dados sugerem um efeito inibitório na invasão do trofoblasto, além de auxiliar na produção de glicoproteínas responsáveis pelo achatamento do trofoblasto ao endométrio (TAPIA *et al.*, 2008). LIF também é capaz de controlar a diferenciação do trofoblasto mediante a expressão do hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG) (CORVENUS *et al.*, 2003).



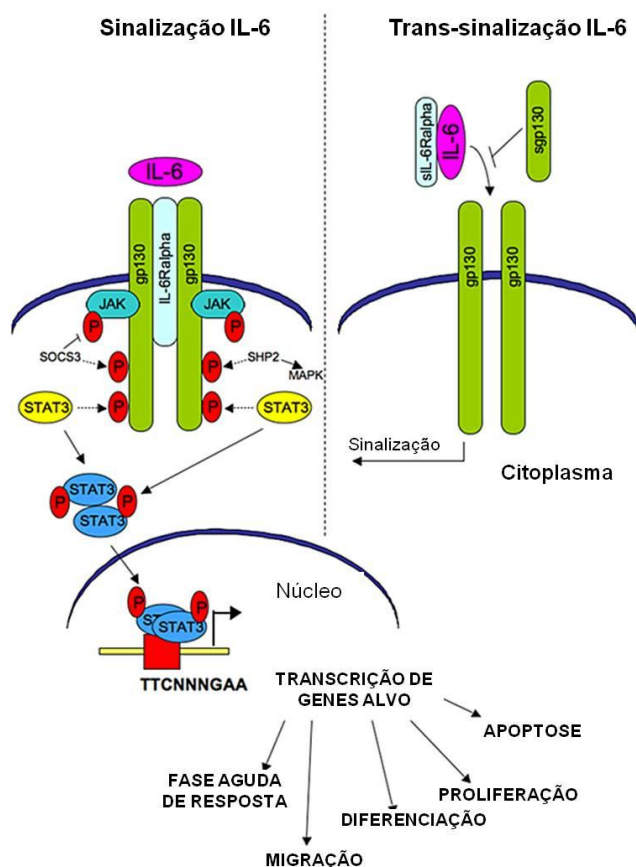
**Figura 2:** Via de sinalização de LIF. A ligação de LIF-LIFR-gp130 desencadeia a cascata de sinalização que irá desencadear a fosforilação de STAT-3, provando auto-renovação celular, sobrevivência e diferenciação (Fonte: Adaptação de *Clinical Science*, 2008)

### → *Interleucina-6 (IL-6)*

A Interleucina-6, assim como LIF, é uma citocina multifuncional, produzida por vários tipos celulares, incluindo células trofoblásticas e glândulas do endométrio (KISHIMOTO, 1989). É mediadora de respostas a infecções e tecidos danificados e das mudanças que antecipam a implantação embrionária e desprendimento menstrual (TABIBZADEH *et al.*, 1995).

Inicialmente, a IL-6 foi identificada como um fator de diferenciação de linfócitos B (BSF-2) que induziam a maturação para células produtoras de anticorpos (HIRANO *et al.*, 1985). Entretanto, uma série de estudos subseqüentes comprovou que a IL-6 atuava não somente nos linfócitos B, mas também nos T, hepatócitos, células progenitoras hematopoiéticas e células neurais (KISHIMOTO *et al.*, 1992) (**Figura 3**).

De acordo com Sherwin *et al.* (2002), IL-6 mostra um padrão de expressão similar ao LIF, apresentando altas concentrações na fase secretória do ciclo menstrual, parecendo sustentar o desenvolvimento de células progenitoras hematopoiéticas em fetos e recém-nascidos, além de ter papel na angiogênese (GARDNER *et al.*, 1990). Além disso, IL-6 interage com o seu receptor no trofoblasto, estimulando a liberação de gonadotrofina coriônica humana (hCG), comprovando o papel importante que esta citocina representa nas mudanças que antecedem a implantação (JAUNIAUX *et al.*, 1996).



**Figura 3:** Via de sinalização de IL-6. A ligação de IL-6 ao receptor de membrana gp130, desencadeia a cascata de sinalização, ativando a ligação JAK-STAT-3, cuja informação é encaminhada para o núcleo para desencadear as respostas celulares (Fonte: Adaptação de Camporeale & Poli, 2012).

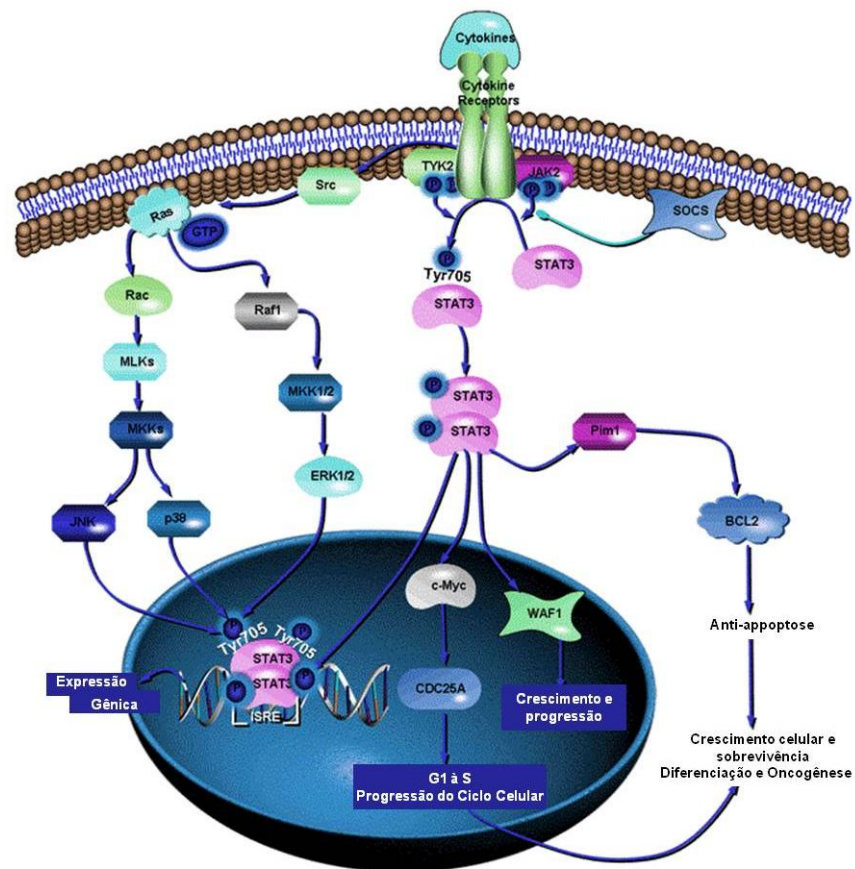
### ➔ *Transmissor de Sinal e Ativador de Transcrição 3 (STAT-3)*

As STATs são proteínas ativadoras de transcrição, responsáveis pela modulação de genes específicos dos processos de crescimento celular, diferenciação e sobrevivência (BOWMAN *et al.*, 2000). São ativadas pela ligação a receptores de superfície celular e



induzem a expressão de programas genéticos ligante-dependentes que determinam a resposta biológica para o estímulo, tendo papéis centrais no desencadeamento da sinalização de fatores que modulam a placentação. Todas as citocinas e muitos fatores de crescimento são capazes de ativar receptores citoplasmáticos de tirosina quinase da família JAK em resposta ativa a fatores de transcrição do tipo STAT (DARNELL, 1997).

As proteínas STAT inicialmente estão presentes de forma inativa no citoplasma, enquanto que as proteínas JAK quinases são constitutivamente associadas a regiões citoplasmáticas próximas da membrana. Após a ligação, a JAK quinase é ativada, levando à fosforilação da STAT-3, que migra para o núcleo e se liga às seqüências do DNA, regulando a transcrição de genes alvos e modulando processos celulares fundamentais como proliferação e diferenciação (AKIRA, 1999) (**Figura 4**).



**Figura 4:** Via de sinalização de STAT-3. Após a ligação da citocina com o receptor de membrana, ocorre a ligação JAK-STAT-3, com consequente fosforilação de STAT-3, que ao migrar para o núcleo desencadeia a expressão de RNAm e consequentemente a síntese proteica para estimular o crescimento, progressão e sobrevivência celular (Fonte: Adaptação de Akira, 1999).

Corvinus e colaboradores (2003) observaram que a deficiência de STAT-3 leva à perda gestacional. Embriões homozigotos (STAT-3  $-/-$ ) se degeneraram e morrem, indicando seu papel crítico no desenvolvimento normal do embrião (BOWMAN *et al.*, 2000).

A ativação aberrante de STAT-3 também tem sido reportada em vários cânceres, como de mama, de pele, de próstata e está associada com tumores metastáticos (POEHLMANN *et al.*, 2005). Estudos de análise de Western Blotting têm demonstrado que a STAT-3 apresenta, durante o primeiro trimestre gestacional, elevada fosforilação com alto padrão de invasividade das células trofoblásticas, mas não em células trofoblásticas no final da gestação (CORVENUS *et al.*, 2003).

### → ***Expressão de telomerase e Proliferação do Trofoblasto***

Os telômeros são estruturas complexas e repetidas de DNA-proteína que conferem estabilidade aos cromossomos, protegendo-os contra a digestão de exonucleases e prevenindo as recombinações aberrantes (LAVELLE *et al.*, 2000). O encurtamento dessas regiões é evidente ao longo da vida e está francamente associado ao número de divisões celulares ocorridas antes da emissão dos sinais para entrada no processo de morte ou senescência.

Durante os primeiros estágios do desenvolvimento humano, a telomerase é necessária para compensar a enorme quantidade de divisões celulares da embriogênese e, por isso, sua expressão é bloqueada (DURANT, 2012).

No caso das células cancerosas e imortais, ocorre escape do sinal por meio do processo que é mediado, via de regra, pela enzima telomerase (KIPLING *et al.*, 1999). Sua atividade tem sido detectada, em humanos, na maioria dos tecidos de linhagem germinativa e tumoral, contrastando com a atividade basal e nula nas células somáticas de adultos (KYO *et al.*, 2000).

De acordo com Shay e Wright (2011), o progressivo encurtamento do telômero durante a divisão celular (envelhecimento replicativo) fornece uma barreira para a progressão do tumor que, para se efetivar, exige seu contínuo crescimento concomitante à reativação da telomerase (KIM *et al.*, 1994).

A telomerase funciona como uma transcriptase reversa que adiciona novo DNA aos telômeros que, por sua vez, são constituídos de várias sequências repetidas de nucleotídeos

TTAGGG associados a um complexo de proteínas e formando estruturas especiais *t-loop* (COLLINS e MITCHELL, 2002; DE LANGE, 2004). Esta configuração protege as extremidades finais dos cromossomos de serem reconhecidas como quebras de fitas simples ou duplas de DNA (SHAY, 2003), o que resulta em senescência replicativa e *check-point* para a morte celular (D'ADDA DI FAGAGNA *et al.*, 2003)

Com relação à placenta humana, a presença de expressão da telomerase sugere seu papel funcional durante a gestação, decaindo, gradativamente, com a aproximação do parto (CHEN *et al.*, 2002). Estudos demonstram que as células citotrofoblásticas humanas conservam o seu potencial proliferativo e retém o telômero integralmente em toda a gestação. Segundo os autores, isto assegura a capacidade de altos índices de proliferação, evento essencial para o crescimento e funcionamento placentário normal (SOUNDARARAJAN e RAO, 2004).

### **→ Invasividade do Trofoblasto X Doenças Trofoblásticas Gestacionais X Oncogênese**

Muitas similaridades existem entre a implantação embrionária e o crescimento de células neoplásicas. O estabelecimento do fenótipo invasivo, em ambos os casos, compreende uma série de processos que incluem a expressão ou repressão de moléculas de adesão específicas, produção de enzimas para digestão da matriz, expressão de produtos de proto-oncogenes, ativação de telomerase e, por último, aquisição de amplo suprimento sanguíneo (SOUNDARARAJAN e RAO, 2004).

As doenças trofoblásticas gestacionais (DTG) representam um grupo único de lesões, por serem derivadas do conceito e não da gestante. Englobam variadas alterações que ocorrem durante os estágios de diferenciação do trofoblasto e que possuem especificidade em sua patogênese, morfologia e apresentação clínica. Ao contrário do que ocorre na gestação normal, na DTG a invasão das células trofoblásticas não é controlada e, além de as células atingirem o miométrio, podem atravessá-lo totalmente (SHIH e KURMAN, 2001; KOBEL *et al.*, 2005).

Dentre os principais tipos de doenças trofoblásticas gestacionais destacam-se: mola hidatiforme completa, mola hidatiforme parcial, mola invasora e coriocarcinoma (PARDINAS e ELSTON, 2003).

A mola hidatiforme completa é geralmente diagnosticada entre a 11<sup>a</sup> e 25<sup>a</sup> semana de gestação, com sangramento vaginal ou excessivo alargamento uterino para a idade gestacional. A ultrassonografia pélvica pode reforçar o diagnóstico de gravidez molar, quando o quadro é acompanhado de altos níveis de gonadotrofina. Entretanto, muitos casos são diagnosticados somente com estudos histológicos dos tecidos advindos de abortos retidos ou eletivos (CHEUNG, 2003). Na mola completa não existe embrião ou feto. Macroscopicamente, é apresentada pela transformação do vilos coriônico em aglomerados de vesículas, com dimensões variáveis. Microscopicamente, o vilos coriônico é apresentado por um acentuado edema, formação de cisterna central e graus variados de proliferação, tanto do citotrofoblasto quanto do sinciciotrofoblasto, geralmente com ausência completa de vasos sanguíneos fetais (ROSAI, 1989).

Diferente da mola completa, as portadoras de mola parcial apresentam poucos sinais e sintomas: aparentam ter um aborto retido, mas apresentam um feto geralmente triplóide (PARDINAS e ELSTON, 2003).

Na mola invasora, clinicamente conhecida como um quadro da doença trofoblástica persistente, os vilos hidróticos invadem o miométrio, vasos sanguíneos ou sítios extra-uterinos. O diagnóstico é geralmente feito na peça de histerectomia e o aspecto macroscópico depende da extensão da invasão. Variável quantidade de vesículas molares pode ser vista na cavidade endometrial, miométrio e em vasos do miométrio, podendo haver perfuração uterina. Hemorragia moderada geralmente está presente. Microscopicamente, a mola invasora é diagnosticada pela presença de vilos molares penetrando o miométrio, com invasão vascular (CHEUNG, 2003).

Coriocarcinoma é a denominação para a neoplasia maligna do trofoblasto, associado clinicamente a sangramento vaginal ou a eventos hemorrágicos no sistema nervoso central, fígado e trato gastrointestinal, relacionados à existência de metástases.

Macroscopicamente, o coriocarcinoma é geralmente uma lesão nodular hemorrágica circunscrita. O tumor primário pode se estender profundamente ao interior do miométrio. Os pulmões, cérebro e fígado são os locais onde as metástases são comuns, o que sugere propagação hematogênica predominante. Microscopicamente, o coriocarcinoma é caracterizado por um padrão bifásico de células: o citotrofoblasto mononuclear, rodeado por sinciciotrofoblasto multinuclear. As células tumorais são encontradas principalmente na periferia da lesão, com extensa hemorragia e necrose central. Na grande maioria dos casos,

o diagnóstico de coriocarcinoma não se associa à presença de vilosidades coriais (CHEUNG, 2003).

Pesquisadores admitem que a invasão do trofoblasto do tecido fetal e a progressão tumoral dependem dos mesmos mediadores bioquímicos e moleculares, sugerindo que várias citocinas que atuam nos diferentes processos celulares são freqüentemente capazes de controlar o comportamento do trofoblasto de algum modo, pela modulação da proliferação e migração, ou induzindo o trofoblasto a se diferenciar em um fenótipo invasivo ou não-invasivo (FITZGERALD *et al.*, 2008).

Muitos dos fatores de sinalização que atuam no trofoblasto ou que são produzidos por ele são conhecidos por desencadear rotas de sinalização via Janus Kinases (JAK) e transmissão de sinais ativadores de transcrição via JAK/STAT (BOWMAN *et al.*, 2000).

Durante a invasão tumoral, mediadores de sinalização são ativados via STAT-3, indicando sua influência no crescimento celular (BUETTNER *et al.*, 2002). A transformação celular pela atividade aberrante da STAT-3 em tumores, aparentemente provoca comportamento neoplásico de proliferação, longevidade e invasão, envolvendo a regulação de genes promotores da progressão do ciclo celular e/ou prevenindo a apoptose (SHEN *et al.*, 2001).

A STAT-3 parece ter papel essencial na organização da motilidade celular de vários tipos tumorais e de células pluripotentes (ZHANG *et al.*, 2002). Além disso, tem sido implicada na regulação transcricional de proteases, de importância crucial para o crescimento celular invasor (BOWMAN *et al.*, 2000). Bishof e Campana (2000) analisaram a expressão de certas metaloproteinases de matriz (MMP), observando que elas são dependentes de IL-6 e, deste modo, dependentes da transmissão de sinalização via STAT-3.

Células citotrofoblásticas, que apresentam um fenótipo invasor, expressam altos níveis de IL-6 e aumentam a atividade de MMP-9 e MMP-2, ambas proteínas importantes nos processos de invasão e implantação (DAS *et al.*, 2002). Aumentada a expressão de MMP, as células citotrofoblásticas se tornam agressivamente invasivas, como nas doenças trofoblásticas gestacionais (BISHOF *et al.*, 2000).

Kong e colaboradores (1996) também observaram que a presença de IL-6, em material de cultura de células de DTG humanas, falha em estimular o crescimento celular, mas a ausência de IL-6 resulta em inibição do crescimento. Além disso, IL-6 é encontrada

no fluido amniótico da gestação inicial, parecendo ser produzida por células trofoblásticas (JAUNIAUX *et al.*, 1996).

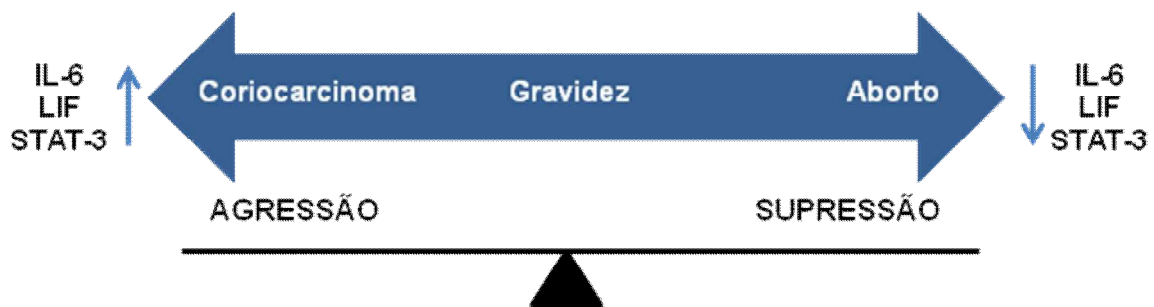
Análises feitas com células de coriocarcinoma humano têm demonstrado que estas aumentam a regulação de HLA-G, uma molécula não-clássica de complexo de histocompatibilidade (MHC) classe I, que parece atuar no encobrimento da célula do sistema imune, em resposta ao LIF (BAMBERGER *et al.*, 2000). Em adição, a LIF poderia promover a invasão e a proliferação de células trofoblásticas e do coriocarcinoma (FITZGERALD *et al.*, 2005).

Segundo Aghajanova *et al.* (2004), durante a janela de implantação, o próprio embrião participa ativamente do processo de implantação uma vez que, em contato com o endométrio, expressa receptores específicos para LIF, indicando um processo de interação mútua embrião-endométrio. Nesta condição o embrião expressa mRNA de LIF enquanto que, no endométrio, a expressão de gp130 e a atividade funcional do receptor de LIF aumentam. Com isso, quando o blastocisto invade o epitélio endometrial e o estroma, ele começa a sintetizar citocinas como a IL-1, induz a expressão de LIF no endométrio (LAIRD, *et al.* 2000).

#### **IV. JUSTIFICATIVA**

O processo de implantação do blastocisto, durante a gestação, está condicionado à funcionalidade das células trofoblásticas, e estas sofrem a atuação direta do fator inibitório de leucemia (LIF), da interleucina-6 (IL-6), do ativador de transcrição-3 (STAT-3) e da telomerase.

O coriocarcinoma é constituído por células do cito e do sinciciotrofoblasto, que se transformam em neoplasia maligna de considerável agressividade. Os estudos sobre o papel destas citocinas são incipientes e até o momento, não são conhecidas as reais associações entre a expressão destas moléculas, isoladas ou em conjunto, no processo de carcinogênese. Este trabalho avaliou a participação das moléculas em abortos, placentas normais a termo e em coriocarcinomas.





## **V. MATERIAL E MÉTODOS**

## **1. DESENHO DE ESTUDO:**

A) Estudo exploratório observacional, retrospectivo, sem intervenção, realizado a partir de material fixado em formalina e embebido em parafina, proveniente de:

- material de curetagem em abortos de primeiro trimestre
- placentas normais a termo
- coriocarcinoma

B) Estudo observacional, sem intervenção, prospectivo, comparado com controle, realizado a partir de cultivo celular de:

- placentas normais a termo
- linhagem celular imortalizada de coriocarcinoma humano, denominado BeWo

## **2. CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA**

### **A) Para o estudo retrospectivo a partir de material fixado:**

Foram selecionados 12 casos de abortos de primeiro trimestre gestacional, 12 casos de placenta de gestação normal a termo e 12 casos de coriocarcinoma, provenientes dos arquivos do blocário do Departamento de Anatomia Patológica da Unicamp/FCM.

O material acima foi compreendido de biópsias fixadas em formalina e embebidas em parafina, cujos blocos estivessem íntegros e em condições de serem submetidos aos ensaios de IHQ e IF. Além disso, foram selecionadas as amostras com um mínimo de 3 blocos em arquivo, de modo a garantir material representativo de reserva no banco de material biológico.

### **B) Para o estudo prospectivo a partir de material *fresco*:**

#### **- Cultura primária de placenta normal a termo**

As placentas foram coletadas após a liberação do material pelo obstetra responsável. Estas eram transferidas para a sala de coleta de material, onde foram retiradas, em condições de absoluta assepsia, pequenos fragmentos das vilosidades coriônicas.

As biópsias de placenta foram rotuladas e transferidas para o laboratório, em frascos contendo meio de cultura Ham's F12 puro para, em seguida, foram recortadas em pequenos fragmentos, removendo-se o sangue e material amorfo e imediatamente tratados por digestão enzimática, com solução ATV (associação tripsina-verseno), durante 60 minutos. A suspensão celular resultante recebeu duas lavagens sucessivas em meio Ham's F12, acrescido de 5% de SFB (soro fetal bovino). Por fim, a suspensões celulares resultantes ( $2 \times 10^6$  células viáveis/ml) foram transferidas para frascos de cultivo celular Falcon X e incubadas em meio Ham's F12 contendo 20% de SFB, durante 3 a 4 horas, para a adesão dos macrófagos à superfície dos frascos. Neste momento as células não aderidas foram transferidas, junto com o meio de cultura, para novos frascos de cultura de 20 cm<sup>3</sup>, visando o cultivo primário das células epiteliais advindas da placenta. A adesão ao substrato ocorria entre 24 e 48 horas após sementeira, após repouso em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Durante 7 dias, os frascos recebiam apenas reposição de meio de cultura, de modo a manter o meio condicionado nos respectivos frascos, de modo a facilitar a proliferação celular *in vitro*. As primeiras colônias instaladas apresentavam o típico padrão de células poligonais, limites celulares nítidos e expansões típicas de células epitelíoides aderidas ao substrato. Não houve, aparentemente, crescimento de células fusiformes do tipo *fibroblast like*. Após 5 a 7 dias de cultivo, os frascos recebiam a primeira troca total de meio de cultivo, sendo o sobrenadante totalmente descartado e as colônias aderentes *lavadas* com o meio de cultivo, visando a remoção de restos tissulares e eventuais elementos amorfos indesejáveis.

A cada 7 dias eram feitos de 3 a 5 repiques celulares em solução ATV, visando a obtenção de suspensões celulares homogêneas, de crescimento uniforme ao longo do substrato. Passado este período, as células em lençol semiconfluente eram removidas dos frascos com *rubber policeman*, eram feitas duas centrifugações sucessivas e concentradas em frascos para posterior congelamento em nitrogênio líquido, onde permaneciam até posterior análise pelo WB e RT-PCR.

#### **- Cultivo da linhagem BeWo (coriocarcinoma humano)**

Células da linhagem BeWo advindas do Banco de Células ATCC (American Type Culture Collection, USA) foram mantidas em laboratório e, após atingirem o estado de semiconfluência, foram destacadas dos frascos com *rubber policeman*, concentradas em

frascos especiais e criopreservadas em nitrogênio líquido, para posterior utilização nos ensaios de Western Blot e Real-time PCR, descritos a seguir.

### **3. TÉCNICAS**

#### **3.1 Imunoistoquímica (IHQ)**

A imunoreatividade para IL-6, LIF e STAT-3 foi investigada nos materiais de aborto, placenta normal a termo e coriocarcinoma, previamente incluídos e emblocados em parafina. Cortes de 4 µm de espessura seguiram o procedimento para desparafinização (xilol 60° C, por 30 minutos/ xilol temperatura ambiente por 40 minutos) e reidratação em série de concentrações decrescentes de etanol.

Após lavadas em 0,1 M tampão Tris-salina (TBS) (TRIS-hidroximetil aminometano, Pharmacia/Biotech, Uppsala, Sweden), pH 7,5 as amostras foram tratadas ao seguinte protocolo:

1. Inibição da enzima peroxidase endógena – incubação em 20 % de peróxido de hidrogênio em metanol, 3 X 10 min; ou da enzima endógena fosfatase alcalina – incubação em 5% ácido acético em TBS; 10 min.
2. Resgate dos sítios antigênicos – imersão das lâminas em tampão TRIS-EDTA (pH 8,9, TRIS-hidroximetil aminometano, Pharmacia/Biotech, Uppsala, Sweden) ou tampão citrato (0,2 M, pH 6,0, Merck, Darmstadt, Alemanha) a 95°C, por 30 min.
3. Incubação com o anticorpo primário diluído em TBS + 1% BSA em câmara úmida (overnight a 4° C) (Tabela 1)
4. Controles negativos – a incubação com o anticorpo primário foi substituída por incubação em TBS + 1% BSA.
5. Incubação com o anticorpo secundário por 30 min, à temperatura ambiente (Tabela 1).
6. Para a imunodeteção de IL-6, LIF e STAT-3 - revelação da atividade peroxidase com 0,66 mg/mL 3,3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) acrescido de 0,3 % de peróxido de hidrogênio, por 10 min.

Após cada etapa de incubação (acima mencionadas) as amostras foram lavadas em solução tampão TBS, pH 7,5. Ao final da reação, foram lavadas em água destilada e

rapidamente contra-coradas com hematoxilina de Mayer por 1 min. Após estarem secas, as lâminas foram cobertas com lamínulas e aderidas de forma permanente pela cobertura com resina Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

As amostras foram observadas ao microscópico de luz convencional (Optiphot-2, Nikon) e as imagens capturadas com o auxílio de uma câmera digital (Nikon Coolpix 995, Media Cybernetics, Japão).

**Tabela 1:** Anticorpos primários e secundários empregados neste estudo – descrição, diluição e estruturas marcadas

Molécula	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário	Procedência	Diluições			Estrutura Marcada
				IHQ	IF	WB	
IL-6	Anticorpo monoclonal mouse anti-IL-6 (1)	Anti-mouse IgG conjugado com peroxidase	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	1:100	_____	1:100	Citoplasma
LIF	Anticorpo monoclonal goat anti-LIF (N18)	Anti-goat IgG conjugado com peroxidase	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	1:50	_____	1:50	Citoplasma
STAT-3	Anticorpo monoclonal mouse anti-STAT-3 (F-2)	Anti-mouse IgG conjugado com peroxidase	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	1:200	_____	1:100	Citoplasma
B-actin (*)	Anticorpo monoclonal mouse anti- $\beta$ -actin	Anti-mouse IgG conjugado com peroxidase	Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA	_____	_____	1:1.000	_____
pSTAT-3	Anticorpo monoclonal mouse anti-pSTAT-3 (9E12)	Anti mouse IgG-FITC	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	_____	1:50	1:100	Núcleo

(\*) Empregada como controle para a análise proteica por Western blotting

### 3.2 Imunofluorescência (IF)

A imunofluorescência foi utilizada para visualização da reação do anticorpo STAT-3 fosforilado, a partir material fixado e incluído em parafina das biópsias de aborto, placenta normal a termo e coriocarcinoma para validar se havia expressão nuclear. Cortes

de 4 µm de espessura seguiram o procedimento para desparafinização (30 min em estufa a 60°C e xilol por 5 minutos) e reidratação em série em concentrações decrescentes de etanol.

Após lavadas em 0,1 M tampão Tris-salina (TBS) (TRIS-hidroximetil aminometano, Pharmacia/Biotech, Uppsala, Sweden), pH 7,5 as amostras foram tratadas como o seguinte protocolo:

1. Recuperação antigênica – imersão das lâminas em citrato (0,2 M, pH 6,0, Merck, Darmstadt, Alemanha) em micro-ondas por 1 min na potência máxima.
2. Eliminação de autofluorescência - imersão das lâminas em solução de água + 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 min.
3. Bloqueio de interação inespecífica com soro de animal da mesma espécie em que foi criado o anticorpo secundário diluído a 5% em PBS-T (tampão PBS com 0,2% de Tween) a 37 °C por 30 min
4. Incubação com o anticorpo primário diluído em TBS + 1% BSA em câmara úmida (overnight a 4° C) (Tabela 1)
5. Incubação com o anticorpo secundário por 1 a 2 horas, em temperatura ambiente (Tabela 1).

Após cada etapa de incubação, as lâminas foram lavadas em solução tampão TBS, pH 7,5 e recobertas com lamínulas em glicerina tamponada.

As amostras foram observadas ao microscópico de fluorescência (Zeiss Axiophot 2) e as imagens capturadas com o auxílio de uma câmera digital (Canon Power Shot G5, USA).

### **3.3 Imunoprecipitação e Western Blotting (WB)**

#### **3.3.1- Extração dos tecidos**

Células provenientes de material *fresco* de placenta normal a termo e sua cultura primária, e de linhagem BeWo foram cultivadas e homogeneizadas em 1,0 ml de tampão de extração de proteínas (1% Triton-X 100, 100 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4), 100 mmol/l pirofosfato de sódio, 100 mmol/l fluoreto de sódio, 10 mmol/l EDTA, 10 mmol/l ortovanadato de sódio, 2 mmol/l PMSF, 0.2 mg/ml aprotinina) à 4°C. Os fragmentos

celulares foram centrifugados por 20 minutos; 11.000 rpm, 4° C, para remoção do material insolúvel e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. A determinação do conteúdo de proteínas totais foi realizada pelo método de biureto, utilizando-se 1,0 ml deste reagente para 20 µl de amostra. Posteriormente foi feita a leitura da quantificação das proteínas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nanômetros. Após a quantificação de proteínas nas amostras, 800 µg de proteínas foram utilizados para imunoprecipitação de proteína.

### **3.3.2- Imunoprecipitação de proteínas**

A técnica de imunoprecipitação de proteínas consiste na incubação de certa quantidade de um extrato proteico com anticorpos específicos. Neste estudo, 800µg de proteína total foram incubados com os respectivos anticorpos primários "*overnight*" a 4°C. Estes se ligam às suas proteínas específicas, formando um complexo anticorpo-proteína. No dia seguinte, este material foi incubado por 2 horas com 35 µl de proteína secundária (já especificados acima) a 4°C. Desta maneira, o complexo anticorpo-proteína liga-se à proteína secundária, a qual por ser pesada, precipita, formando um imunoprecipitado. Após esta incubação, foram feitas três lavagens seguidas de centrifugação, com tampão específico. As proteínas precipitadas foram tratadas com tampão de Laemmli contendo 100 mM de DTT e aquecidas em água fervente por 5 min. Em seguida, foram colocadas para eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE.

### **3.3.3- Western Blotting (WB)**

A concentração dos géis de poliacrilamida para a análise de proteínas é determinada conforme o tamanho destas. As proteínas IL-6, LIF e STAT-3 apresentam peso molecular de 21-28 KDa, 45KDa e 91KDa, respectivamente. As duas primeiras, devido ao seu pequeno tamanho, foram colocadas em gel de poliacrilamida a 10%, enquanto que, para a última, empregou-se gel de poliacrilamida a 8%.

A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD, a 120 V, por 2 horas. A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana em tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado, 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, 0,02% Tween 20) a 4°C, "*overnight*". Após o bloqueio, a membrana foi novamente

incubada nas mesmas condições com anticorpos específicos anti-IL-6, anti-LIF e anti-STAT-3, diluídos em 10 ml de solução basal e 3% de albumina bovina (95% pureza, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA). As bandas proteicas específicas foram vistas por meio de reação de anticorpos terciários conjugados à peroxidase e detectados por quimioluminescência (Kit Pierce ECL, Rockford, IL, EUA). As membranas foram expostas a um filme de RX em cassete apropriado. As áreas das bandas identificadas na radiografia foram quantificadas por densitometria óptica. Para tal, foi utilizado um *scanner* de uma impressora multifuncional HP PSC 1315 (HP ®) e o empregado o programa Image J 1.44p (National Institutes of Health, EUA®).

### 3.4 Extração do RNA

Os fragmentos de material *fresco* de placenta normal a termo e células de sua cultura primária, assim como células de linhagem BeWo conservados em Qiazol Lysis Reagent (Qiagen, Duesseldorf, Germany) foram descongelados rapidamente seguindo-se a extração do RNA total segundo ensaio com Trizol (Invitrogen Corporation, CA, USA). Para tal, após o descongelamento das células, foram adicionados 250 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol, homogeneizando-se por inversão e centrifugando-se a 10.500 g por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e colocado em novo frasco, no qual foi precipitado com 500 µL de isopropanol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) durante 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10.500 g por 10 minutos, a 4°C e, os *pellets* aderidos na parede do frasco foram ressuspensos em 500 µL de 75 % etanol. Após nova centrifugação a 8.400 g por 10 min, a 4°C, as amostras foram solubilizadas em 30 µL de água MiliQ, quantificada e, a concentração e pureza do RNA total, calculadas por espectrofotometria, na absorbância  $A_{260}$  e por meio da relação  $A_{260}/A_{280}$  respectivamente.

Para a produção do cDNA utilizou-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), sendo a concentração final do cDNA de 3,0 µg. Este cDNA foi diluído segundo a concentração necessária para a amplificação eficiente de cada gene, sendo esta eficiência verificada segundo método descrito abaixo.



### 3.5 PCR quantitativo (qPCR) – *Real Time PCR*

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA), que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. Para os genes da telomerase, IL-6, LIF e STAT-3 utilizamos respectivamente os seguintes *assays* (TaqMan™ - Applied Biosystems®) Hs00162669\_m1, Hs00985639\_m1, Hs00171455\_m1 e Hs01047580\_m1.

O gene *GAPD Human* (TaqMan™ - Applied Biosystems®), Part number 4352338E, foi o escolhido como controle endógeno da reação, que serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. A sonda *GAPD* está marcada com o fluoróforo VIC, enquanto os *primers* para os alvos estão marcados com o fluoróforo FAM.

Antes de iniciarmos os experimentos de quantificação relativa da expressão de qualquer gene, realizamos a validação do sistema gene alvo, no caso, telomerase, IL-6, LIF e STAT-3 com o controle endógeno *GAPD human*. Verificamos que as eficiências de amplificação dos genes foram próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse.

### 3.6 Validação da eficiência dos genes de interesse

A validação consiste na amplificação, tanto com os *primers* dos genes de interesse quanto com o do controle endógeno, dos cDNAs em triplicata, em cinco concentrações diferentes (diluições seriadas) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Em seguida, foi construída uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct [*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (*Threshold*), o qual é definido arbitrariamente]. Nessa curva, foram obtidos os valores da inclinação (*slope*) da curva e da confiabilidade das réplicas (R<sup>2</sup>). Dessa forma, a eficiência do um sistema é calculada através da fórmula:

$$E = 10(-1/slope) - 1.$$

Para a placa de validação do gene da telomerase foram feitas triplicatas de uma amostra de cDNA do material *fresco* de placenta normal a termo e sua cultura primária, e da linhagem celular de coriocarcinoma em 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 5x).

Após o cálculo das eficiências de amplificação de cada gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual tem por finalidade definir qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema é eficiente. Para a construção do gráfico, foram utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. A seguir, foi obtida uma linha de tendência para estes valores, que possui uma equação de reta na qual é possível verificar o valor da inclinação desta reta. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiverem mais próximos à linha de tendência são considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações).

Para a quantificação relativa do gene em estudo, as reações de PCR em tempo real foram em duplicata a partir de: 6,25µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0,625µL da solução de *primers* e sonda, 1,625µL de água e 4,0µL de cDNA, sendo que no controle negativo, foi adicionado 4,0 µL de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems®). No programa BioEstat 3.0 foram realizados os testes estatísticos *two-way* ANOVA com replicação (análise de variância) e Kruskal-Wallis para verificar se há diferença significativa na expressão do gene de interesse.

### **3.7 Análise Estatística**

A expressão citoplasmática obtida nas reações imunistoquímicas de IL-6, LIF e STAT-3 foi considerada leve, moderada ou intensa, de acordo com a intensidade da coloração.

As bandas de proteínas obtidas no ensaio de Western Blotting foram quantificadas por densitometria digital usando o software Image J (Image J 1.42q, NIH, Bethesda, Maryland, USA).

Os valores médios  $\pm$  EPM (erro padrão de medida) obtidos a partir de exames de densitometria, PCR em tempo real, bioquímicos e determinações metabólicas foram comparados de acordo com os seguintes grupos de dados: para IHQ e IF: aborto, placenta normal e coriocarcinoma; para WB e PCR em tempo real: material *fresco* de placenta normal, cultura primária de placenta normal e linhagem de células BeWo.

Além das estatísticas descritivas, foram realizadas comparações entre os dados por meio dos testes de Qui-quadrado para comparação de proporções e os testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis para comparação de médias, atribuindo-se como resultado estatisticamente significativo para os valores de  $p \leq 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa comercial PASW Statistics (SPSS) 18.0.

## **VI. ASPECTOS ÉTICOS**

Foram respeitados os princípios da Declaração de Helsinque (World Medical Association, 2000). Com a finalidade de manter em sigilo a identidade das mulheres, as lâminas obtidas a partir dos blocos de parafina foram recebidas apenas com o número interno de identificação. O número de registro do hospital e o número da biópsia que, eventualmente, poderiam permitir identificar estas mulheres foram destacados da ficha de registro de informações antes da digitação dos mesmos em planilha.

Considerando a abordagem retrospectiva do estudo, que utilizou material biológico arquivado, que não resultou em mudança para o tratamento das pacientes, o Comitê de Ética em Pesquisa local aprovou o estudo com dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Parecer N° 368/2009) para as biópsias arquivadas no Departamento de Anatomia Patológica. Para coleta das placentas *fresco* foi aplicado o Termo de Livre e Esclarecido (TCLE) às gestantes em início de trabalho de parto que concordaram em participar da pesquisa (**anexo 1**).

## **VII. RESULTADOS**

## 6.1 Imunodeteção em Material de abortos

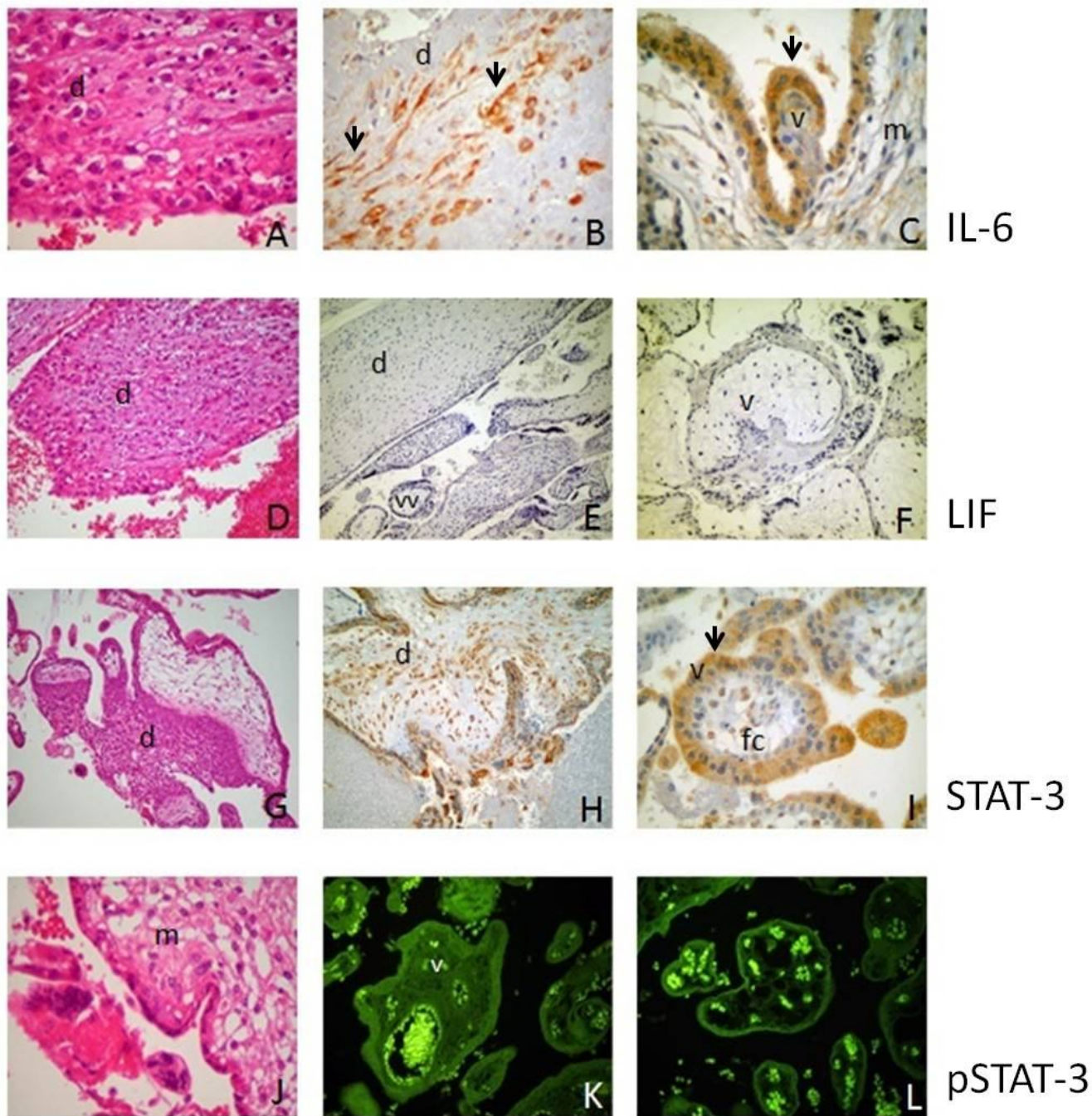
A expressão citoplasmática para as reações de IL-6, LIF e STAT-3 foi considerada leve, moderada ou intensa, de acordo com a intensidade da coloração.

Em biópsias de abortos, observaram-se células moderadamente reativas para IL-6 no citotrofoblasto e no sincitiotrofoblasto das vilosidades coriais, em 58,4% dos casos (**Fig. 5 B-C**). Para LIF, nenhuma imunomarcção foi observada (**Fig. 5 E-F**), enquanto que o STAT-3 mostrou intensa coloração em 33,3% das biópsias analisadas e sendo localizadas nas células decíduais, células do cito e sincitiotrofoblasto viloso e trofoblasto não viloso, assim como em células mesenquimatosas dos vilos (**Tabela 2; Fig. 5 H-I; Fig. 8**).

Para verificar a presença de STAT-3 fosforilada (pSTAT-3), foram realizados ensaios de imunofluorescência em biópsias de aborto. Entretanto, não se observou expressão nuclear da molécula em qualquer dos materiais estudados. (**Fig. 5 K-L**).

**Tabela 2. Imunodeteção de IL-6, LIF, STAT-3 e pSTAT-3 em Abortos**

Citocinas	Intensa	Moderada	Fraca	Negativa
IL-6 (N=12)	0,0 %	58,4 %	33,3 %	8,3 %
LIF (N=12)	0,0 %	0,0 %	0,0 %	100,0 %
STAT-3 (N=12)	33,3 %	50,0 %	16,7 %	0,0 %
pSTAT-3 (N=12)	0,0 %	0,0 %	0,0 %	100,0 %



**Figura 5. Cortes histológicos em HE e imunodeteção em Biópsias de Abortos para IL-6 (B-C), LIF (E-F), STAT-3 (H-I) e Imunofluorescência para STAT-3 fosforilada (pSTAT-3) (K-L).** É possível observar a reação positiva no citoplasma das células trofoblásticas e da decídua basal para IL-6 e STAT-3 e reação negativa para LIF e STAT-3 fosforilada. Observe células reativas (cabeça das setas) na decídua (d), vilos (v), mesênquima (m), vasos vilosos (vv) e capilares fetais (fc). Observe que na reação de imunofluorescência não há marcação nuclear e o material fluorescente corresponde a hemácias. (Objetiva 4X: E; objetiva 10X: B, D, F, G, H, K, L; objetiva 40X: A,C,I,J)



## 6.2 Imunodeteção em Material de placenta normal

A expressão citoplasmática para as reações imunoistoquímicas de IL-6, LIF e STAT-3 foi considerada leve, moderada ou intensa, de acordo com a intensidade da coloração.

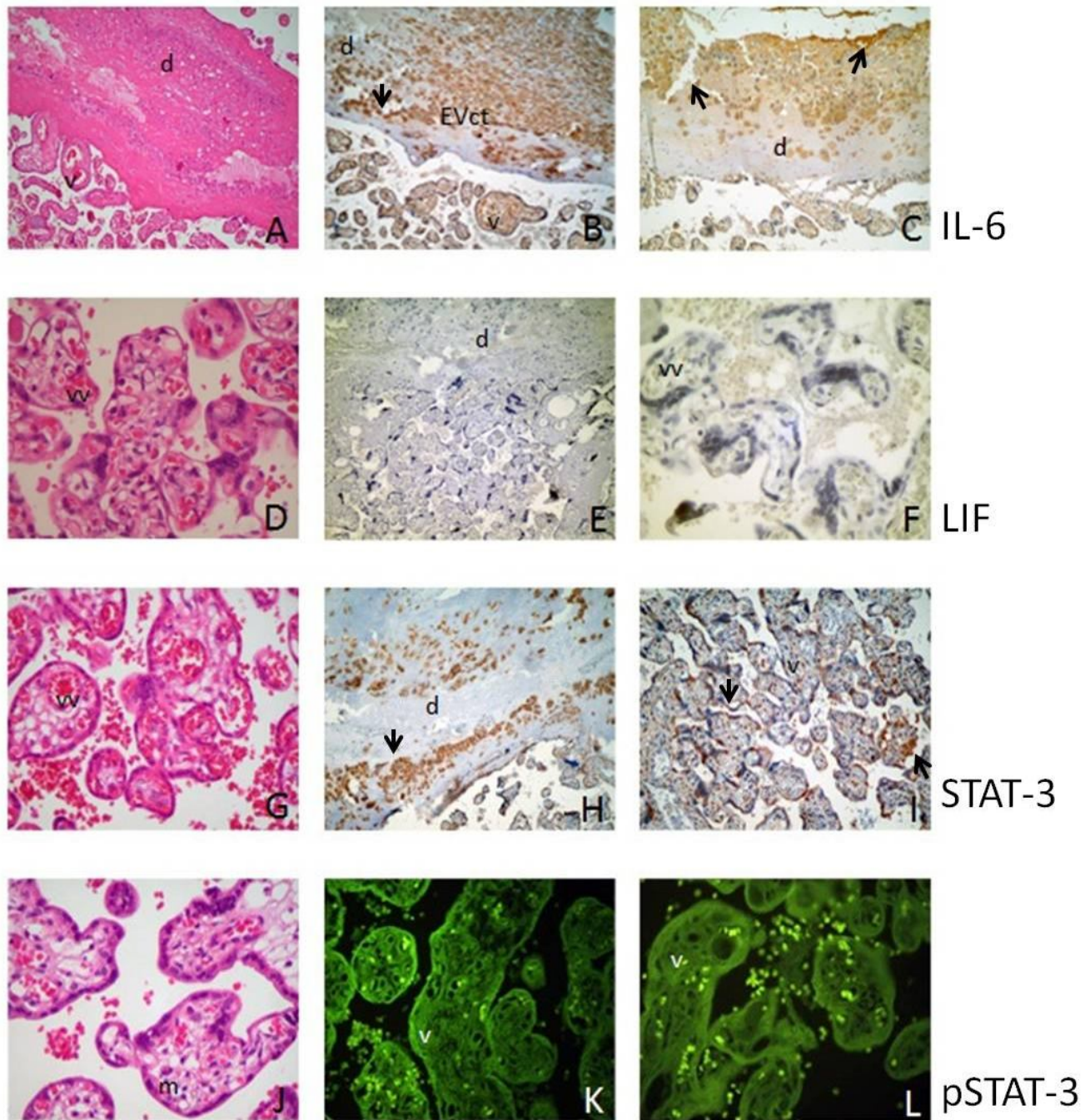
Em material de placenta normal a termo observou-se intensa expressão para IL-6 em 50% dos casos com células imunorreativas em diferentes compartimentos da placenta e da decídua. Nos vilos coriônicos, IL-6 foi expressa no citoplasma do sinciciotrofoblasto, em células endoteliais de capilares e vasos fetais, em células musculares dos vasos vilosos e em células mesenquimatosas do estroma viloso. Na região da decídua, houve expressão principalmente nas células do citotrofoblasto extraviloso, mas, ocasionalmente, em células endoteliais e em células musculares dos vasos (**Tabela 3; Fig. 6 B-C; Fig. 9**).

Em relação à expressão de LIF, esta foi nula (**Fig. 6 E-F**), enquanto que a expressão de STAT-3 mostrou-se intensa em 16,7% dos casos no cito e sinciciotrofoblasto das vilosidades coriais, em algumas células da decídua e nas células do trofoblasto extra-viloso na decídua basal (**Fig. 6 H-I**).

Reação de Imunofluorescência foi realizada com o intuito de verificar se havia expressão nuclear para STAT-3 fosforilada em placentas normais a termo, onde observou-se expressão negativa (**Fig. 6 K-L**).

**Tabela 3. Imunodeteção de IL-6, LIF, STAT-3 e pSTAT-3 em Placenta Normal**

Citocinas	Intensa	Moderada	Fraca	Negativa
IL-6 (N=12)	50,0 %	33,3 %	16,7 %	0,0 %
LIF (N=12)	0,0 %	0,0 %	0,0 %	100,0 %
STAT-3 (N=12)	16,7 %	75,0 %	8,3 %	0,0 %
pSTAT-3 (N=12)	0,0 %	0,0 %	0,0 %	100,0%



**Figura 6. Cortes histológicos em HE e Imunodeteção em Placenta Normal a termo para IL-6 (B-C), LIF (E-F), STAT-3 (H-I) e Imunofluorescência para STAT-3 fosforilada (K-L).** Observam-se células reativas (cabeça das setas) no citotrofoblasto extraviloso (Evct), no vilão (v), no endotélio dos vasos vilosos (vv) e na decídua basal (d). Observe que na reação de imunofluorescência não há marcação nuclear e o material fluorescente corresponde a hemácias. (Objetiva 10X: A,B,C, E, H, I; objetiva 40X:D, F, G, J, K, L)

### 6.3 Imunodeteção em Material de coriocarcinoma

A expressão citoplasmática para as reações imunoistoquímicas de IL-6, LIF e STAT-3 foi considerada leve, moderada ou intensa, de acordo com a intensidade da coloração.

Em material de coriocarcinoma observou-se expressão de IL-6 nas células neoplásicas do cito e sincitiotrofoblasto de forma semelhante à observada nas placentas normais, com grau intenso em 50% dos casos (**Tabela 4; Fig. 7 B-C; Fig. 10**).

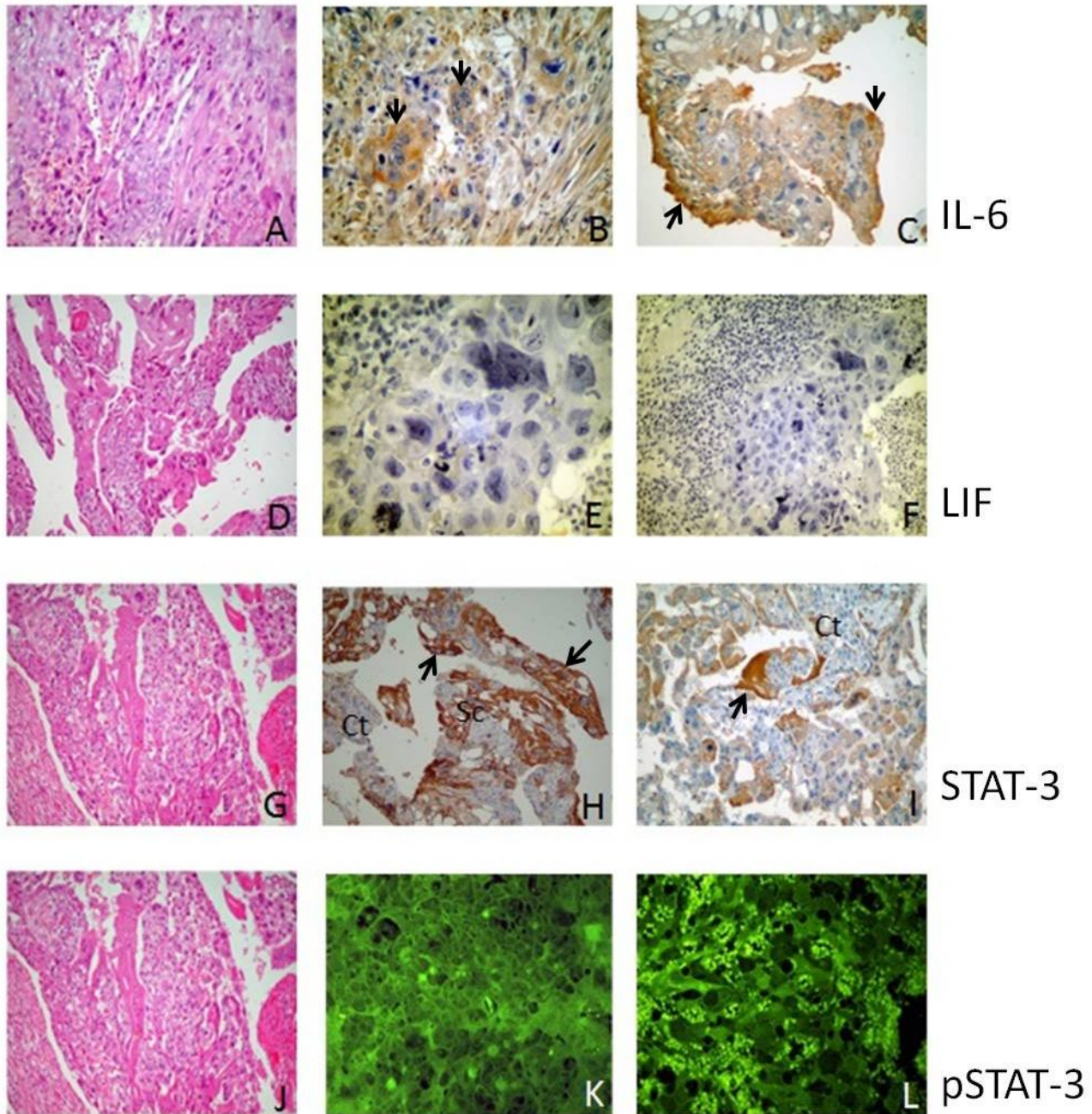
Em relação à expressão de LIF, novamente se apresentou nula (**Fig. 7 E-F**), enquanto que STAT-3 foi intensamente expressa no citoplasma do cito e sincitiotrofoblasto, em células endoteliais, células musculares dos vasos sanguíneos, assim como em células decíduais do estroma e endométrio residual em 75% dos casos, quando existentes na amostra da biópsia do coriocarcinoma (**Fig. 7 H-I**).

A reação de imunofluorescência foi realizada com o intuito de verificar se havia expressão nuclear para STAT-3 fosforilada (pSTAT-3), porém o resultado foi negativo também (**Fig. 7 J-L**).

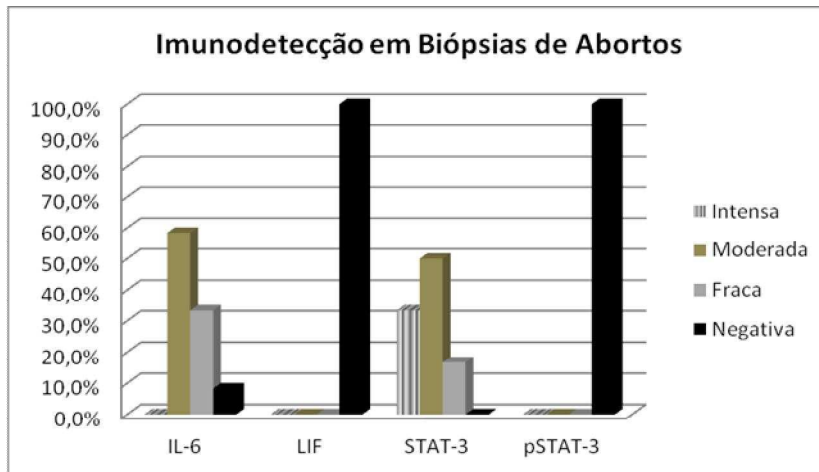
A análise estatística comparativa entre os 3 grupos estudados (aborto, placenta normal a termo e coriocarcinoma) mostrou diferenças estatisticamente significantes para o STAT-3 ( $p=0,037$ ), mas não para IL-6 ( $p=0,092$ ). Porém, quando se comparam os grupos entre si, a análise do IL-6 mostrou valores estatisticamente significantes entre a expressão no grupo de aborto em relação à placenta normal ( $p=0,037$ ) e entre aborto e coriocarcinoma ( $p=0,028$ ).

**Tabela 4. Imunodeteção de IL-6, LIF, STAT-3 e pSTAT-3 em Coriocarcinoma**

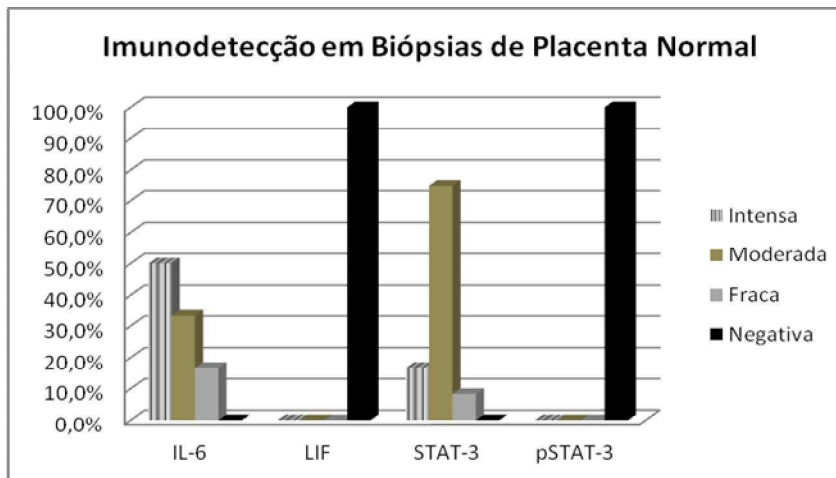
Citocinas	Intensa	Moderada	Fraca	Negativa
IL-6 (N=12)	50,0 %	41,7 %	8,3 %	0,0 %
LIF (N=12)	0,0 %	0,0 %	0,0 %	100,0 %
STAT-3 (N=12)	75,0 %	25,0 %	0,0 %	0,0 %
pSTAT-3 (N=12)	0,0 %	0,0 %	0,0 %	100,0%



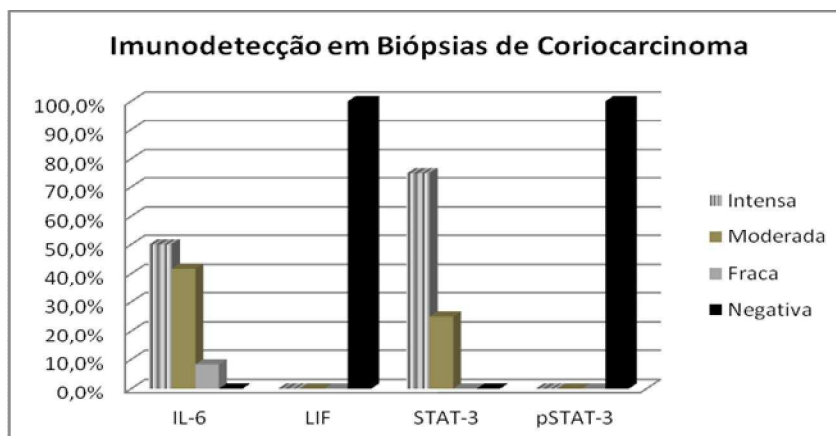
**Figura 7. Cortes histológicos em HE e Imunodeteção em Biópsias de Coriocarcinoma de IL-6 (B-C), LIF (E-F) e STAT-3 (H-I) e Imunofluorescência para STAT-3 fosforilada (K-L).** Observam-se células reativas (cabeça das setas) no citotrofoblasto (Ct) e sinciciotrofoblasto (Sc). pSTAT-3 não apresentou expressão nuclear à imunofluorescência. (Objetiva 10X: A, D, F, G, H, J; objetiva 40X: B, C, E, I, K, L)



**Figura 8. Imunodeteção de IL-6, LIF, STAT-3 e pSTAT-3 em Abortos:** relação da intensidade da reação e a porcentagem de casos reagentes. Notar a moderada expressão de IL-6, intensa e moderada expressão de STAT-3 e expressão nula de LIF e pSTAT-3 em todos os casos estudados.



**Figura 9. Imunodeteção de IL-6, LIF, STAT-3 e pSTAT-3 em Placenta Normal a Termo:** relação da intensidade da reação e a porcentagem de casos reagentes. Notar expressão intensa e moderada de IL-6 e STAT-3; LIF e pSTAT-3 não foram expressas em todos os casos estudados.



**Figura 10. Imunodeteção de IL-6, LIF, STAT-3 e pSTAT-3 em Coriocarcinomas:** relação da intensidade da reação e a porcentagem de casos reagentes. Notar a expressão intensa e moderada de IL-6 e STAT-3 e expressão nula para LIF e pSTAT-3 em todos os casos estudados.

#### 6.4 Análise Proteica de IL-6, LIF, STAT-3 e STAT-3 fosforilada em material *fresco* por Western Blotting

Na Figura 8, observamos bandas de aproximadamente 43 KDa detectadas pelo anticorpo  $\beta$ -actina utilizado como controle de reação nas amostras de material *fresco* de placenta normal, sua cultura primária e da linhagem BeWo.

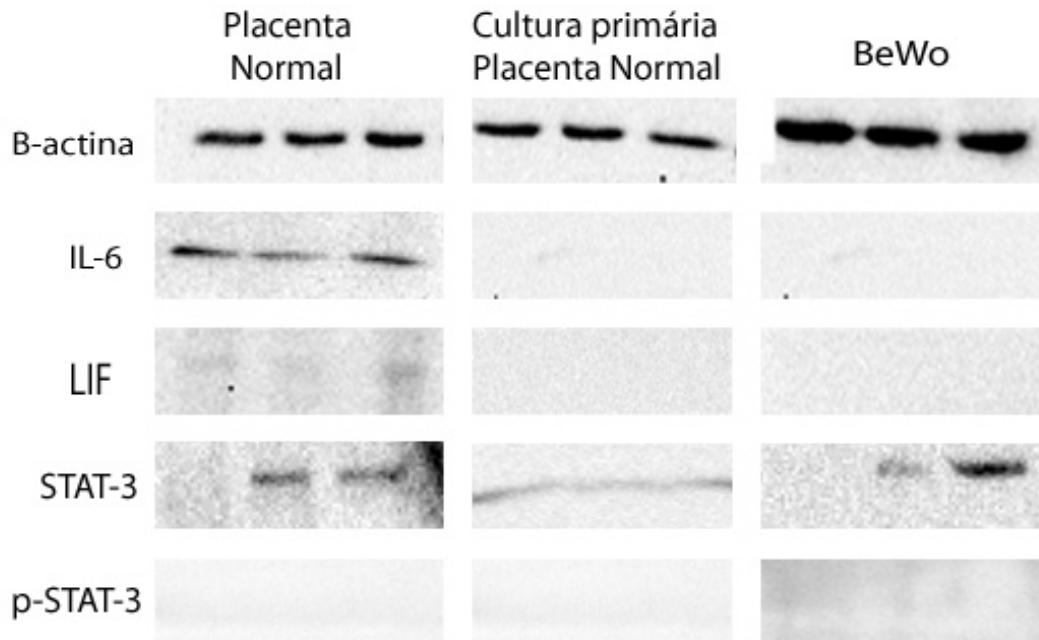
Foi observada expressão proteica de IL-6 em amostras de material *fresco* de placenta normal, mas ausência de expressão em sua cultura primária e nas linhagens de BeWo. Em relação à expressão de LIF, foi muito fraca no material *fresco* de placenta normal e ausente na cultura primária de placenta normal e na linhagem BeWo.

A análise de STAT-3 foi realizada com o intuito de verificar a expressão proteica no citoplasma e no núcleo, e para este último utilizamos um anticorpo de STAT-3 fosforilada (pSTAT-3). Observamos que houve detecção proteica citoplasmática para STAT-3 em todos os grupos estudados, sendo a expressão na placenta normal semelhante à da linhagem BeWo, porém menor na cultura primária de placenta normal a termo. Em relação à expressão nuclear da pSTAT-3, esta foi ausente em todos os grupos estudados. (**Tabela 5; Fig. 11; Fig. 12**).

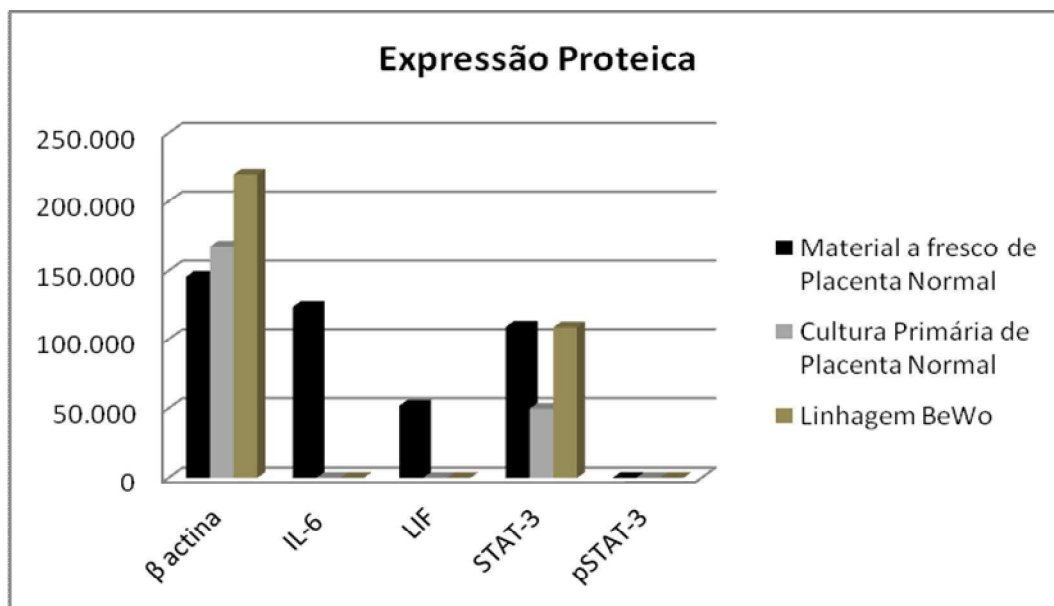
A análise estatística comparativa das médias dos resultados do WB entre os 3 grupos (placenta *fresco*, cultura primária de placenta e linhagem BeWo) não demonstrou diferenças significantes para STAT-3, com  $p=0,180$  (Kruskal-Wallis). A análise comparativa dos grupos entre si (Mann-Whitney), também não mostrou diferenças, com valores não significantes para STAT-3, entre os grupos ( $p=0,083$ ,  $p=0,083$  e  $p=0,121$ ).

**Tabela 5 – Expressão Proteica de IL-6, LIF, STAT-3 e pSTAT-3 em material *fresco* de placenta normal, sua cultura primária e linhagem celular BeWo (WB)**

Material	B actina	IL-6	LIF	STAT-3	pSTAT-3
Material <i>fresco</i> de Placenta Normal	145.755	123.403	51.937	109.198	0.0
Cultura Primária de Placenta Normal	167.647	0.0	0.0	49.689	0.0
Linhagem BeWo	219.647	0.0	0.0	108.759	0.0



**Figura 11. Western blotting** para identificação proteica de β-actina (como controle de reação) (42 KDa), IL-6 (21-28 KDa), LIF (22 KDa), STAT-3 (86-91 KDa) e pSTAT-3 (86-91 KDa) em amostras de tecido fresco de placenta normal, cultura primária de placenta normal e linhagem celular BeWo. IL-6 não foi expresso nas amostras de cultura primária de placenta normal e BeWo, STAT-3 foi expresso em todas as amostras, enquanto que não houve expressão de pSTAT-3; LIF foi fracamente expresso apenas no tecido fresco de placenta normal.



**Figura 12. Expressão Proteica de β actina, IL-6, LIF, STAT-3 e STAT-3 fosforilada (pSTAT-3) em material fresco de placenta normal, sua cultura primária e linhagem celular BeWo (Western Blotting).** Observa-se expressão de IL-6 e LIF nos materiais a fresco de placenta normal e ausência na cultura primária e na linhagem BeWo. Nota-se expressão de STAT-3 e ausência de pSTAT-3 em todos os grupos.

### 6.5 Expressão Gênica de IL-6, LIF, STAT-3 e Telomerase em Material fresco detectada por Real-Time PCR

Antes de iniciarmos os experimentos de quantificação relativa da expressão de qualquer gene, realizamos a validação do sistema gene alvo, no caso, telomerase com o controle endógeno GAPD *human*. Verificamos que as eficiências de amplificação dos genes foram próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse.

As análises do gene para telomerase Hs00162669\_m1 (TaqMan™ - Applied Biosystems®), por real-time PCR, mostraram expressão positiva e fortemente aumentada nos coriocarcinomas em relação às amostras de tecido a fresco de placenta normal e sua cultura primária ( **Tabela 6; fig. 13**). Estas não apresentaram qualquer expressão para o mesmo gene, mas, ao mesmo tempo, evidenciaram expressão do gene GAPD *human*, de modo a garantir a confiabilidade técnica do ensaio empregado.

Devido aos resultados obtidos a partir das análises de Western Blotting, decidimos realizar a análise dos genes IL-6, LIF e STAT-3, visando confirmar os resultados da expressão proteica. Para tanto, utilizamos os respectivos genes: Hs00985639\_m, Hs00171455\_m1 e Hs01047580\_m1 (TaqMan™ - Applied Biosystems®).

A análise gênica de IL-6, LIF e STAT-3 mostrou resultados consistentes com os observados na análise de WB. É possível observar que na análise gênica, IL-6 apresentou expressão forte nos materiais *fresco* de placenta normal, mas na sua cultura primária e na linhagem BeWo foi muito fraca (**Tabela 6; Fig. 13**). Em relação à expressão gênica para LIF, esta também foi muito baixa em todos os grupos.

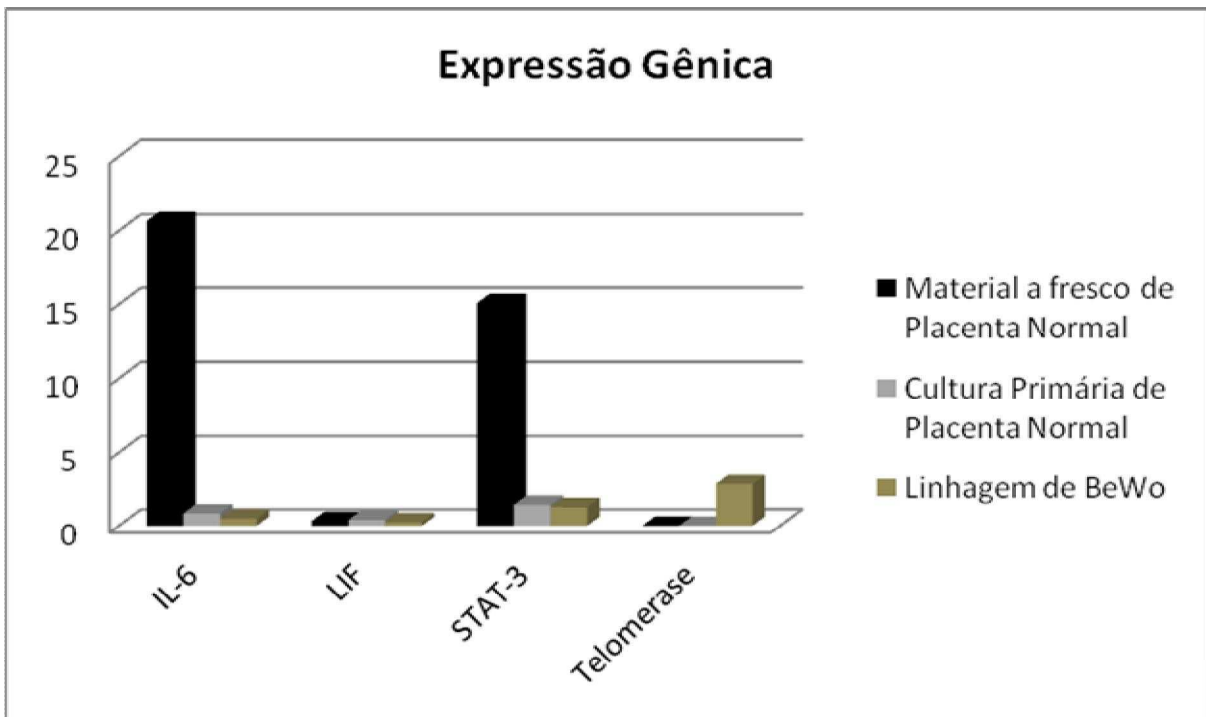
A análise gênica para STAT-3, mostrou expressão também maior na placenta normal *fresco* em relação à sua cultura primária e à linhagem de células BeWo.

Por outro lado chama a atenção a forte expressão gênica da telomerase da linhagem BeWo contrastando com a completa falta de expressão tanto no material *fresco* de placenta normal como em sua cultura primária.

**Tabela 6. Expressão Gênica de IL-6, LIF, STAT-3 e Telomerase em materiais fresco de placenta normal, sua cultura primária e linhagem celular BeWo (Real time PCR)**

Material	IL-6	LIF	STAT-3	Telomerase
Material <i>fresco</i> de Placenta Normal	20.65	0.33	15.078	0
Cultura Primária de Placenta Normal	0.8325	0.41	1.41	0
Linhagem BeWo	0.479	0.2385	1.2675	2.825





**Figura 13.** Expressão Gênica de IL-6, LIF, STAT-3 e Telomerase em materiais *fresco* de placenta normal, sua cultura primária e linhagem celular BeWo (Real time PCR). Observa-se muito baixa expressão de LIF em todas os grupos e a expressão aumentada de IL-6 e STAT-3 no material *fresco* de placenta normal. A telomerase apresentou alta expressão apenas na linhagem BeWo.

A análise estatística dos resultados da expressão gênica pelo Real-time PCR foi feita pela comparação das médias (Kruskal-Wallis) entre os 3 grupos (tecido *fresco* de placenta, cultura primária de placenta normal e linhagem BeWo). Não houve diferenças entre os grupos estudados para IL-6 ( $p=0,180$ ), LIF ( $p=0,276$ ) e STAT-3 ( $p=0,102$ ). Ao fazermos as análises estatísticas dos grupos entre si (Mann-Whitney), também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (valores de  $p$  variando de 0,121 a 0,439).

## **VIII. DISCUSSÃO**

## 7.1 Morfologia Placentária

Na placenta normal, o trofoblasto pode ser classificado de acordo com a sua localização e características citológicas, onde o trofoblasto viloso se refere ao trofoblasto que reveste o vilo coriônico, enquanto que o trofoblasto do sítio de implantação, que se infiltra na decídua, miométrio e vasos sanguíneos é chamado de trofoblasto extraviloso.

Morfologicamente, três diferentes tipos de trofoblasto são descritos: o citotrofoblasto (CT), constituído por células mononucleares responsáveis pela proliferação, o sinciotrofoblasto (ST), constituído por células multinucleadas mais diferenciadas responsáveis pela produção de hormônios e o trofoblasto intermediário (TI), constituído por células trofoblásticas com características funcionais semelhantes aos tipos anteriores, porém com formato colunar, de modo a ancorar a placenta no sítio de implantação (LUNGHI, 2007; COHEN & BISHOP, 2007, SALAMONSEN, 2009).

À semelhança do que ocorre nas gestações normais, onde o trofoblasto invade o tecido materno no primeiro trimestre da gravidez, nas doenças trofoblásticas, principalmente no coriocarcinoma, ocorre a invasão tecidual, porém descontrolada, associada à ampla gama de distúrbios clínicos (WELLS, 2007).

Dentre as DTG, o coriocarcinoma se destaca pela agressividade tumoral e pelo potencial de geração de metástases (CHEUNG, 2003). Segundo Lurain (2010), as taxas de mortalidade por coriocarcinoma chegam a quase 100%, na presença de metástases, e é de aproximadamente 60% quando o tratamento cirúrgico é feito com aparente ausência de metástase. Entretanto, estes dados são muito limitados, uma vez que coriocarcinomas são raros.

Macroscopicamente, o coriocarcinoma se apresenta como uma lesão nodular única ou múltipla, hemorrágica, circunscrita ou profundamente infiltrada no miométrio (CHEUNG, 2003). Microscopicamente, é caracterizado por proliferação e anaplasia do cito e sinciotrofoblasto, com necrose, hemorragia, ausência de vilosidades coriais e presença de invasão vascular, o que facilita as metástases que acometem preferencialmente os pulmões, cérebro, fígado, pélvis e vagina, rins, intestinos e baço (LURAIN, 1990). É composto por um padrão bifásico com células citotrofoblásticas mononucleares rodeadas pelos sinciotrofoblastos multinucleares, sendo as células tumorais viáveis encontradas principalmente na periferia da lesão, com hemorragia e necrose no centro (CHEUNG, 2003). Este aspecto morfológico foi observado nos nossos casos estudados, onde

encontramos frequentemente poucos agrupamentos de células neoplásicas de permeio a extensas áreas de necrose e hemorragia.

## **7.2 Citocinas**

Processos intracelulares como a transdução de sinais são um campo atrativo a ser estudado uma vez que as células trofoblásticas controlam seu crescimento e invasão no espaço e no tempo, principalmente na decídua e durante o primeiro trimestre gestacional (FITZGERALD, 2008). O efeito das citocinas locais, produzidas pelos próprios trofoblastos ou pelas células adjacentes, é mediado pelas vias múltiplas de sinalização intracelular, algumas ainda não totalmente entendidas. Uma das vias mais importantes parece ser o sistema integrado pela Janus-quinase e o transmissor de sinal e ativador de transcrição (STAT), conhecido como via JAK-STAT. Muitas citocinas atuam nos múltiplos passos desta via e, no nosso estudo, estudamos a interleucina 6 (IL-6), o fator inibidor da leucemia (LIF) e STAT-3.

### **7.2.1: Papel da IL-6**

O sucesso da implantação embrionária depende da adequada orquestração entre proliferação, migração e invasão do trofoblasto no endométrio, de modo a estabelecer a ancoragem e o suprimento sanguíneo do feto, por meio da formação da câmara vilosa (DUBINSKY, *et al.*, 2010). Estudos têm indicado o papel do IL-6 no controle desses eventos e o sistema imune materno é um participante crítico no estabelecimento, progressão e manutenção da gestação (MUNOZ-SUANO *et al.*, 2011).

Durante o período de pré-implantação, um ambiente pró-inflamatório facilita a preparação da implantação do embrião e a aquisição de tolerância imune materna e, após a implantação, para a maioria das gestações avançadas, passa a prevalecer um ambiente anti-inflamatório, o qual irá restringir o sistema imunitário, sustentando células regulatórias supressoras que são uma característica da tolerância na gravidez. Ao final da gestação, um ambiente pró-inflamatório novamente surge, definindo o cenário do parto e do nascimento (PRINS *et al.*, 2012).

Estudos de Gutiérrez e col. (2004) têm demonstrado o papel da IL-6 neste processo, em razão de suas conhecidas funções tanto pro como anti-inflamatórias, dependendo do estágio do processo reprodutivo (HILL *et al.*, 1995; RAGHUPATHY, 1997).

Tanto a deficiência quanto o excesso de IL-6 podem gerar problemas reprodutivos, levando a um interesse renovado na forma como essa citocina contribui para a fertilidade e infertilidade (PRINS *et al.*, 2012).

De acordo com Prins *et al.* (2012), a proteína IL-6 e seu RNAm são expressos no tecido decidual e na placenta ao longo da gestação, em diferentes concentrações dependendo do período (DE *et al.*, 1992). Isso porque a citocina IL-6 está diretamente relacionada com a angiogênese e o remodelamento vascular requerido para a morfogênese no início da gestação. Além disso, é responsável pelo controle do balanço entre as propriedades aderentes da invasão adquiridas pelo trofoblasto na morfogênese placentária, com diferentes efeitos na sua expressão gênica, dependendo do estágio de diferenciação (CHAMPION *et al.*, 2012), indicando que sua bioatividade ao longo da gestação parece ser muito bem regulada.

Nossos dados das reações imunoistoquímicas confirmaram os relatos da literatura (JAUNIAUX *et al.*, 1996; PAULE *et al.*, 2000), uma vez que a IL-6 esteve presente desde os primeiros estágios de diferenciação, representados pelas amostras de aborto de primeiro trimestre, com intensificação desta expressão ao longo da gestação (placentas normais a termo) e mantendo este alto padrão durante a carcinogênese do tecido trofoblástico, no coriocarcinoma. Por outro lado, a perda de expressão gênica e proteica de IL-6 nos tecidos cultivados *in vitro* reforça a idéia de que esta citocina deve ser requisitada nos processos de invasão e proliferação celular, os quais são paulatinamente desativados durante a formação do lençol confluyente na cultura (KRUSE & MIEDEMA, 1965).

Segundo Jasper e col. (2007) a moderada expressão de IL-6 nos materiais de abortos é consistente com as funções conhecidas de IL-6 na coordenação do equilíbrio de fenótipos de células T, gerando populações celulares necessárias para o estabelecimento da tolerância imunológica na gravidez. A alta expressão de IL-6 nas placentas normais a termo está diretamente relacionada com os processos fisiológicos do parto, uma vez que a IL-6 estimula a contratilidade uterina por meio da indução da expressão de ocitocina (FANG *et al.* 2000).

De acordo com Fujisawa e col. (2000), a IL-6 também é responsável não só por promover o desenvolvimento de células progenitoras hematopoiéticas em fetos e recém-nascidos (GARDNER *et al.*, 1990), mas também por atuar no suprimento adequado de sangue para as células neoplásicas e seu crescimento tumoral progressivo (MOTRO, *et al.*, 1990), concordando com nossos resultados que evidenciaram intensa expressão imunistoquímica desta citocina nas biópsias de coriocarcinoma.

O papel das citocinas na regulação das funções celulares da placenta humana pôde ser comprovado por Laird (1994) e Tabibzadeh *et al.* (1995). Estes autores demonstraram que a IL-6 foi produzida *in vitro* pelas células estromatosas e epiteliais do endométrio humano, em resposta ao estímulo pela IL-1 e pelo fator de necrose tumoral (TNF), resultando na inibição de proliferação das células do epitélio glandular endometrial.

Comparando estas observações acima com nossos dados, é bem provável que resultados diferentes seriam obtidos se analisássemos a produção de IL-6 durante as fases de adesão ao substrato e formação de colônias, durante os 3 primeiros dias de implantação das células ao sistema *in vitro*. Nossos resultados sugerem ainda que IL-6 deve ser um importante fator de invasão proliferativa da placenta normal e que é mantido durante a carcinogênese, se considerarmos os resultados das amostras de coriocarcinoma

Visando esclarecer alguns desses aspectos, alguns autores empregaram ensaios imunocitoquímicos a culturas primárias de placentas, advindas de material de aborto, revelando que a IL-6 expressa no trofoblasto interagia com seus receptores, estimulando a liberação de gonadotrofina coriônica humana (HCG) e promovendo o processo de implantação e desenvolvimento embrionário (NISHINO *et al.*, 1990). Isso acontece porque a IL-6 promove diretamente a liberação de hormônios pituitários, incluindo hormônio do crescimento (GH), prolactina (PRL) e luteinizante (LH), estimulando também a liberação de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que secreta HCG no trofoblasto, ativando diferentes vias de sinalização na placenta para estimular sua liberação (NISHINO *et al.*, 1990).

A expressão de IL-6 também tem sido descrita em outros tipos de neoplasias, como em células de carcinomas renais. Segundo Paule *et al.* (2000), a IL-6 expressa por estas células sugere que, em razão do fator de crescimento autócrino atribuído a essa citocina, sua ação pode exercer um efeito estimulador nas células primárias do carcinoma renal. A IL-6 também é fortemente expressa em tumores metastáticos, reforçando seu papel na

invasão tecidual exercida pelas células neoplásicas (COSTES *et al.* 1997; PAULE *et al.*, 1998; FITZGERALD, *et al.*, 2008).

Assim, a ausência de expressão proteica e gênica verificada nos cultivos celulares e a presença da citocina nos tecidos fixados parecem comprovar a sua importância no processo de invasão e proliferação tissular, independentemente do seu caráter maligno (FUJISAWA *et al.*, 2000).

### 7.2.2 Papel do LIF

Muitos paralelos podem ser traçados entre a gestação e o câncer, principalmente no que se refere à capacidade de invasão do útero pelas células trofoblásticas, tanto no sentido morfológico quanto funcional (FITZGERALD *et al.*, 2005).

Na literatura, uma das principais citocinas que atuam nesse processo é a LIF, comprovadamente crítica para a placentação de camundongos. Nestes roedores, sua produção pelo endométrio é espacial e temporariamente distinta, atuando ainda na invasão, migração e proliferação do trofoblasto (MORRISH *et al.*, 1998).

Desde 1992, Stewart e seu grupo sugeriram que a LIF e seu receptor LIFR seriam produzidos pelo epitélio endometrial, no momento da fixação do blastocisto. A comprovação desta hipótese veio com a utilização de camundongos *Knockout* para LIF (genótipo nulo para LIF), os quais apresentavam infertilidade secundária devido à falha de implantação do blastocisto (FOULADI-NASHTA *et al.*, 2005).

Em humanos, sabe-se que a produção de LIF está aumentada no epitélio glandular do endométrio e no estroma endometrial, durante a metade da fase secretora do ciclo menstrual (CORK *et al.*, 2001; CORK *et al.*, 2002; AGHAJANOVA *et al.*, 2003). Para Dimitriadis *et al.* (2010) tal expressão faz sentido, uma vez que as mudanças nas propriedades do epitélio luminal do endométrio são essenciais para a adesão do blastocisto. Parelalamente, estudos *in vitro* têm apontado que a proteína LIF participa da adesão das células epiteliais do embrião ao endométrio humano, por meio da fibronectina e do colágeno IV (MARWOOD *et al.* 2009) produzidos tanto na superfície do blastocisto (SHIMOMURA *et al.*, 2006) como nas células trofoblásticas durante o primeiro trimestre de gestação. Baseando-nos nestes dados, concordamos que seria interessante observar esta particularidade da LIF em estudos futuros, com observação e análise de produção de matriz

extracelular, incluindo colágeno IV e fibronectina pelas células trofoblásticas, após sucessivos repiques no mesmo frasco de cultivo.

Marwood e col. (2009) também demonstraram que a inibição direta da ativação da STAT-3 bloqueia a ação de LIF, responsável por mediar a adesão das células epiteliais do endométrio à fibronectina, sugerindo que a citocina LIF utiliza mecanismos de transdução de sinal via STAT-3.

Diferente do que esperávamos, nossos resultados mostraram ausência de expressão de LIF nas biópsias de abortos, de placentas normais a termo e de coriocarcinomas nos ensaios de imunistoquímica. No Western Blotting, a expressão proteica foi difícil de ser avaliada, com marcação borrada, considerada muito baixa no material de placenta *fresca*. Pela RT-PCR, a expressão gênica de LIF foi muito baixa. As reações imunistoquímicas foram feitas várias vezes e até solicitamos nova amostra do anticorpo ao fornecedor. Nunca obtivemos positividade.

Considerando que a expressão de LIF foi negativa, resolvemos analisar a expressão de STAT-3 fosforilada, para verificar se a molécula estava ativada no núcleo celular gerando, conseqüentemente, síntese proteica. Além disso, buscamos na literatura dados que pudessem explicar os nossos resultados. Constatamos que a expressão de STAT-3 fosforilada também foi negativa, condizente com a falta da expressão de LIF.

De acordo com pesquisas de Fitzgerald e col. (2005), a citocina LIF pode ser inibida por meio de “*feed-back*” na via de regulação JAK-STAT (NAKA *et al.*, 1997), podendo este fato explicar a ativação temporal de STAT-3 no epitélio luminal, que atinge seu auge no início da receptividade do útero e implantação do embrião de camundongo (CHENG *et al.*, 2001). Poderíamos indagar se o aumento de intensidade da reação sugere que as células estavam no aguardo desta ativação temporal, podendo ser objeto de futuros estudos.

Considerando os aspectos acima, a via de sinalização de LIF para estimulação de células BeWo dependeria da ativação da cascata de sinalização JAK-STAT, que é capaz de mediar diferentes ações de LIF. Com isso, a LIF estaria associada a mecanismos mais complexos, podendo ter ações divergentes, promotoras e inibidoras, relacionadas à produção e controle de proteínas pelas células sinciciotrofoblásticas (LEDUC, 2011). Em adição, em humanos, a expressão de LIF não depende apenas da presença do trofoblasto, uma vez que sua secreção pode ser regulada por outras citocinas presentes no ambiente uterino, assim como pelos hormônios sexuais maternos (UZUMEU *et al.*, 1998).



Por conta de suas múltiplas e divergentes ações, LIF tem sido muito estudada e continua sendo vista como uma peça de quebra-cabeças de difícil solução (METCALF D, 2003). Se a LIF é responsável por múltiplas ações, também existem condições que regulam ou inibem estas ações. Para LIF, bem como para outras citocinas, há agentes intracelulares capazes de bloquear ou reduzir a sinalização disparada pelo ligante, sendo estes agentes membros da família das citocinas supressoras de sinalização (SOCS). Tipicamente, a produção das proteínas SOCS é rapidamente induzida pela sinalização da LIF ou da IL-6 e, conseqüentemente, leva à completa inibição da sinalização da LIF (METCALF D, 2003).

Através da regulação de proteínas supressoras de sinalização de citocina 3 (SOCS3), que suprimem a via de sinalização de transdução JAK-STAT, induzida por um amplo espectro de citocinas, incluindo a LIF, é desencadeada a inibição da atividade da JAK quinase, por falta da ligação de alta afinidade de SOCS3 à proteína JAK quinase (ROBERTS *et al.*, 2001) (**Figura 14**).

O que se observa na atuação das SOCS3 são os efeitos inibitórios, como reduzida fosforilação de STATs (SONG & SHUAI, 1998), reduzida dimerização de STAT (STARR *et al.*, 1997) ou reduzida importação de STAT para o núcleo (SONG & SHUAI, 1998), além de reduzida transcrição de genes alvo (NAKA *et al.*, 1997). Como os genes das SOCS são induzidos por citocinas e, suas proteínas correspondentes são inibidas, acredita-se que as proteínas SOCS formem parte de um mecanismo de *feed-back* negativo, o que justificaria os resultados obtidos em nosso estudo.

Desta forma, as proteínas SOCS representam potentes moduladores da sinalização e expressão do LIF, podendo inibi-lo diante da produção da proteína SOCS3 (FITZGERALD, 2005; STARR *et al.*, 1997; SUTHERLAND, 2003; TAKAHASHI *et al.*, 2003; TAKAHASHI *et al.*, 2008), indicando que SOCS3 é um regulador essencial da sinalização de LIF na diferenciação de células do sinciciotrofoblasto. (TAKAHASHI *et al.*, 2008).

Outras possibilidades ainda podem ser aventadas para tentar explicar os nossos resultados: LIF poderia atuar, de modo indireto, na proliferação das células tumorais, ou ainda, que realmente nenhum estímulo para esta citocina esteja efetivado, o que poderia sugerir que a proliferação tumoral não estaria ocorrendo via LIF-LIFR-STAT-3.

Embora estudos prévios tenham apontado o papel da citocina LIF na diferenciação e invasão do trofoblasto (FITZGERALD, 2005, 2008), a interação com outras citocinas ainda é um assunto desafiador e merece maior investigação futura.

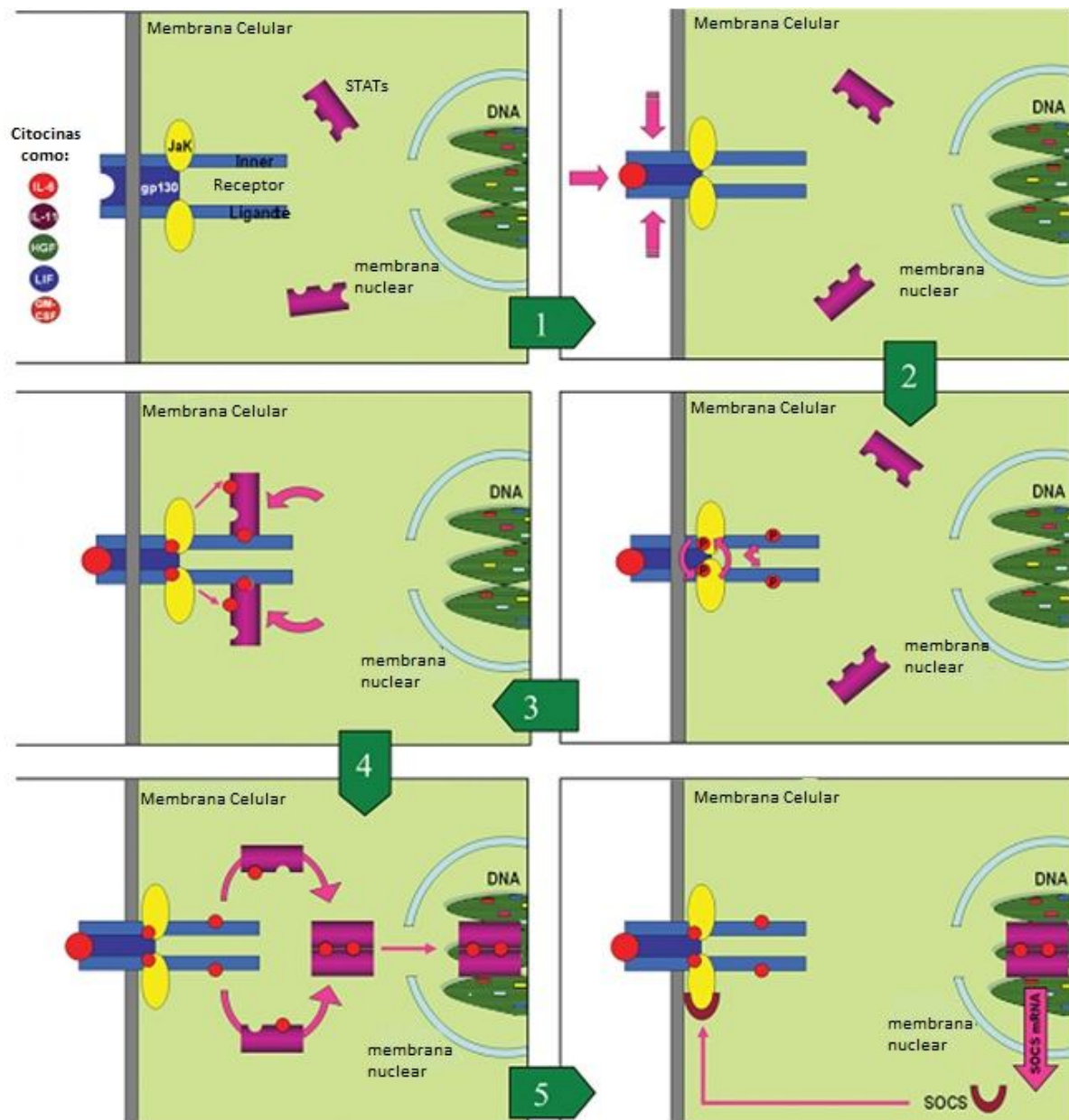
### 7.2.3 Papel de STAT-3

As STATs são conhecidas proteínas ativadoras de transcrição, responsáveis por carregar informações do citoplasma para o núcleo, expressas pela maioria dos tipos celulares e ativadas por uma variedade de citocinas e fatores de crescimento. Nas citocinas da família IL-6, elas são capazes de induzir a expressão de ligantes dependentes de programas genéticos que irão determinar uma resposta biológica diante de um estímulo (AKIRA 1999).

Embora originalmente esta proteína tenha sido descoberta como efetora das vias de sinalização normal de citocinas que regulam a proliferação, diferenciação e apoptose celular, estudos têm demonstrado a participação das proteínas STATs em sinalizações que se associam a um comportamento invasivo neoplásico em muitos estudos e em oncoproteínas (HIRANO *et al.*, 1997; BOWMAN *et al.*, 2000; FITZGERALD *et al.*, 2008).

A maioria dos receptores de citocinas consiste de duas a três cadeias de polipeptídeos, chamados de cadeia receptora ligante-específica e um tradutor de sinal que é comumente usado pela maioria das citocinas (TAGA & KISHIMOTO, 1992). A natureza deste sistema receptor explica a redundância funcional das citocinas, que formam um complexo receptor-ligante, capaz de estimular uma única cascata de sinalização da citocina, a via JAK-STAT, responsável pela ativação de genes alvos no núcleo (IHLE, 1995; KISHIMOTO *et al.*, 1995).

A precisa via de regulação da ativação da STAT se faz crítica, no que se refere a provocar uma apropriada via de sinalização extracelular. Estudos comprovam que, quando o controle da ativação da STAT está desregulado, uma alteração da sua sinalização ocorre, contribuindo para a transformação maligna destas células, promovendo assim a progressão do ciclo celular e/ou sobrevivência celular. (FITZGERALD *et al.*, 2008). Devido ao fato de as STATs regularem diretamente a expressão dos genes, este fato pode indicar a presença de sinalização desregulada destas proteínas observadas em oncogenes, com consequente aquisição da alteração permanente no programa genético.



**Fig. 14. Via de sinalização JAK-STAT.** (1) Ligação da citocina ao seu receptor de membrana; (2) Ativação da via Janus Kinase (JAK), resultando na fosforilação da tirosina, (3) Ligação de STAT ao seu receptor ativado por JAKs, (4) STATs ativada se dissocia para formar homo e heterodímeros que são translocados para o núcleo para acelerar a transcrição de proteínas-alvo, (5) as SOCS, uma família de proteínas-alvo limitam ainda mais a ativação STAT ligando-se a JAKs. (Adaptado de Fitzgerald *et al.*, 2008).

Segundo Takahashi e col. (2008), a cascata de sinalização JAK-STAT-3 é uma importante via de diferenciação de células trofoblásticas, uma vez que a STAT-3 é conhecida por sua habilidade em regular a expressão de proteínas que aumentam a invasão e migração de células tumorais (BOWMAN *et al.*, 2000; GERMAIN & FRANK, 2007;

CHAN *et al.*, 2008). Assim, a intensa e progressiva presença de STAT-3 não fosforilada observada em nosso estudo imunistoquímico ao longo da gestação (abortos e placentas a termo) e do coriocarcinoma, parece confirmar a possibilidade de que a via JAK-STAT-3 seja progressivamente desativada após a nidação e implantação do feto no endométrio. A partir de então, são exigidos tanto a desativação desta via preferencial como o acionamento de vias alternativas para sustentar a gestação até seu término. No processo de carcinogênese, a desativação de STAT-3 não acionaria mecanismos de apoptose, o que favorece a estabilidade de clones celulares atípicos do coriocarcinoma.

Em uma primeira análise poderíamos afirmar que a forte expressão imunistoquímica de STAT-3 nas biópsias e na análise por WB, estaria associada a intensa atividade de proliferação e motilidade (ou capacidade de invasão) celular, mais pronunciada nos coriocarcinomas.

Entretanto, diante dos diferentes resultados da expressão de IL-6 na imunistoquímica e no WB e da ausência de LIF nos dois grupos, decidimos analisar a expressão nuclear da proteína STAT-3 (pSTAT-3), com o objetivo de avaliar se realmente estaria havendo estímulo para indução de transcrição de mRNA e consequentemente, síntese proteica.

Nossos resultados desta análise mostraram que não houve expressão da pSTAT-3 no núcleo por imunofluorescência e nem por Western Blotting, justificando e dando suporte à falta de expressão proteica de IL-6 e LIF.

Essas observações contradizem os dados de Chan *et al.* (2008), onde análises de biópsias de coriocarcinomas apresentaram intensa expressão citoplasmática e nuclear da STAT-3 em relação aos materiais de placentas normais a termo e placentas de primeiro trimestre. Por outro lado, a alta expressão citoplasmática de STAT-3 nas biópsias de coriocarcinomas, associadas à expressão nula da forma fosforilada justificariam o fato da sua via de sinalização normal estar interrompida nos coriocarcinomas, o que coincide com os achados de Akira (1999).

Considerando que as citocinas exerçam respostas proliferativas e antiproliferativas, dependendo do tipo celular, o papel das vias de sinalização das STAT-3 no controle e apoptose celular requer ainda muitas investigações.

### 7.3 Telomerase e Real-Time PCR

A telomerase é uma transcriptase reversa celular, que adiciona repetições hexaméricas 5'-d(TTAGGG)-3' no final 3' da hélice do DNA cromossômico, conferindo estabilidade e integridade das regiões teloméricas do cromossomo. Estudos comprovam que a atividade da telomerase está associada à maioria dos tumores humanos malignos, uma vez que o aumento de sua atividade, nas células tumorais, mantém a integridade dos telômeros e assegura a capacidade de proliferação celular (COLLINS *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2002).

Segundo Castellucci & Kaufmann (2000), em gestações normais o trofoblasto viloso consiste em uma população de citotrofoblasto proliferativo, que se diferencia e individualmente se funde para formar o sinciciotrofoblasto (HUPPERTZ *et al.*, 1998). No primeiro trimestre da gestação, a taxa de proliferação do citotrofoblasto é alta (CASTELLUCCI *et al.*, 2000), diminuindo gradativamente nos meses seguintes, sendo que, no terceiro trimestre, a taxa da proliferação geral do trofoblasto cai para cerca de 10% dos valores do primeiro trimestre (CHEN *et al.*, 2002).

Nossos resultados comprovaram este comportamento no grupo de placentas a termo, uma vez que a expressão da telomerase para o gene Hs00162669\_m1 foi zero no tecido *fresco* de placenta normal e sua cultura primária, quando comparada à sua alta expressão na linhagem BeWo, demonstrando a importância da telomerase no processo de proliferação neoplásica.

De acordo com dados de CHEN *et al.* (2002), de 37 amostras de placenta normal a termo, somente 11 (30%) expressaram alguma atividade de telomerase, contrastando com a expressão nula de 26 espécimes (70%). No mesmo estudo, 100% das amostras de coriocarcinoma evidenciaram a atividade de telomerase.

Desta forma, o aumento da atividade da telomerase nas células BeWo reforça sua relação com o fenótipo maligno e o aponta como um bom marcador para progressão da doença.

## **IX. CONCLUSÃO**

Nossos resultados permitiram concluir que:

(i) Pelas reações imunoistoquímicas, a presença de expressão de IL-6 e STAT-3 nos materiais de coriocarcinoma indica que a neoplasia utiliza as mesmas vias estimulatórias da placenta durante o seu desenvolvimento;

(ii) A expressão proteica de IL-6 no material *fresco* de placenta normal, mas sua ausência nas culturas estudadas sugere que IL-6 é desativada no processo de cultura, onde ocorre inibição de contato e consequente desativação de proliferação celular, tanto no tecido normal quanto no tumoral.

(iii) A forte expressão imunoistoquímica da STAT-3 no coriocarcinoma e sua expressão proteica nas células BeWo se associa à pronunciada atividade de proliferação celular na neoplasia;

(iv) A falta de expressão nuclear da STAT-3 fosforilada em todos os grupos estudados, sugere que a via JAK-STAT esteja desativada;

(v) A falta de expressão de LIF, nas amostras de tecido normal e neoplásico por meio de qualquer dos métodos utilizados, diferente do esperado, pode indicar que LIF esteja sendo inibida por meio das proteínas supressoras de sinalização ou que possa atuar, mas de modo indireto, na proliferação das células trofoblásticas;

(vii) A expressão gênica para a telomerase apenas nas células BeWo indica que a atividade da telomerase está associada à progressão tumoral no coriocarcinoma.

## **X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- AKIRA S. Functional Roles of STAT Family Proteins: Lessons from Knockout Mice. **Stem Cells** 17:138-146, 1999.
- APLIN JD, KIMBER SJ. trophoblast-uterine interactions at implantation. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, 2: 48-59, 2004.
- AGHAJANOVA L, STAVREUS-EVERS A, NIKAS Y, HOVATTA O, LANDGREN BM. Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. **Fertil Steril.** 79(Suppl. 1):808–14, 2003.
- AGHAJANOVA L. Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1034: 176-183, 2004.
- AKIRA S. Functional Roles of STAT Family Proteins: Lessons from Knockout Mice. **Stem Cells**;17: 138-146, 1999.
- BAMBERGER AM, JANATSCHKE S, SCHULTE HM, LONING T, BAMBERGER MC. Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates the human HLA-G promoter in JEG3 choriocarcinoma cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**; 85: 3932-3936, 2000.
- BISCHOF P, CAMPANA A. Molecular mediators of implantation. **Baillieres Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, 14: 801-814, 2000.
- BISCHOF P, MEISSER A, CAMPANA A. Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion – a review. **Placenta**, 21: S55, 2000.
- BOWMAN T, GARCIA R, TURKSON J, JOVE R. STATs in oncogenes. **Oncogene**, 19: 2474-2488, 2000.
- BUETTNER R, MORA LB, JOVE R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. **Clin Cancer Res.**, 8:945-954, 2002.
- CASTELLUCCI M, KOSANKE G, VERDENELLI F, HUPPERTZ B, KAUFMANN P. Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development. **Hum Reprod Update.** 6(5):485-94, 2000.
- CAVAGNA M, MANTESE JC. Biomarkers of Endometrial Receptivity – A Review. **Placenta**, 24: S39-S47, 2003.

CHAMPION, H., INNES, B.A., ROBSON, S.C., LASH, G.E., BULMER, J.N. Effects of interleukin-6 on extravillous trophoblast invasion in early human pregnancy. **Mol. Hum. Reprod.**, 18(8):391-400, 2012.

CHAN HY, SIU MKY, ZHANG HJ, WONG ESY, NGAN HYS, CHAN KYK, CHEUNG ANY. Activated Stat3 expression in gestational trophoblastic disease: correlation with clinicopathological parameters and apoptotic indices. **Histopathol.** 53:139-146, 2008.

CHEN RJ, CHU CT, HUANG SC, CHOW SN, HSIEH CY. Telomerase activity in gestational trophoblastic disease and placental tissue from early and late human pregnancies. **Hum. Reprod.**, 17: 463-468, 2002.

CHENG JG, CHEN JR, HERNANDEZ L, ALVORD WG, STEWART CL. Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate STAT-3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98: 8680-8685, 2001.

CHEUNG ANY. Pathology of gestational trophoblastic diseases. **Best Prac. Res. Clin. Obstet. Gynecol.**, 17: 849-868, 2003.

COHEN M, BISHOP P. Factors Regulating trophoblast invasion. **Gynecol Obstet Invest.** 64(3):126-30, 2007.

COLLINS K, MITCHELL JR. Telomerase in the human organism. **Oncogene.** 21:564-79, 2002.

CORK BA, LI TC, WARREN MA, LAIRD SM. Interleukin-11 (IL-11) in human endometrium: expression throughout the menstrual cycle and the effects of cytokines on endometrial IL-11 production *in vitro*. **J Reprod Immunol.** 50(1):3-17, 2001.

CORK BA, TUCKERMAN EM, LI TC, LAIRD SM. Expression of interleukin (IL)-11 receptor by the human endometrium *in vivo* and effects of IL-11, IL-6 and LIF on the production of MMP and cytokines by human endometrial cells *in vitro*. **Mol Hum Reprod.** 8(9):841-8,2002.

CORVENUS FM, FITZGERALD JS, FRIEDRICH K, MARKET UR. Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT-3 activity. **Am. J. Reprod. Immunol.**, 50: 316-321, 2003.

COSTES V, LIAUTARD J, PICOT MC, ROBERT M, LEQUEUX N, BROCHIER J, BALDET P, ROSSI JK. Expression of the interleukin 6 receptor in primary renal cell carcinoma. **J Clin Pathol.** 50: 835-40, 1997.

D'ADDA DI FAGAGNA F, REAPER PM, CLAY-FARRACE L, FIEGLER H, CARR P, VON ZGLINICKI T, SARETZKI G, CARTER NP, JACKSON SP. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. **Nature** 13;426(6963):194-198,2003.

DARNELL JE Jr. STATs and gene regulation. **Science**, 277: 1630-1635, 1997.

DAS C, KUMAR VS, GUPTA S, KUMAR S. Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells. **J. Reprod. Immunol.**, 53: 257-268, 2002.

DE, M., SANFORD, T.H., WOOD, G.W. Detection of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in the uterus during the second half of pregnancy in the mouse. **Endocrinol.** 131, 14-20, 1992.

DE LANGE T. T-loop and the origin of telomeres. **Nat Rev Mol Cell Biol.**; 5(4):323-9, 2004.

DIMITRIADIS E, MENKHORST E, SALAMONSEN LA, PAIVA P. Review: LIF and IL11 in trophoblast-endometrial interactions during the establishment of pregnancy. **Placenta.** 24: S99-S104, 2010.

DUBINSKY V, POEHLMANN TG, SUMAN P, GENTILE T, MARKERT UR, GUTIERREZ G. Role of Regulatory and Angiogenic Cytokines in Invasion of Trophoblastic Cells. **Am. J. Reprod. Immun.** 63: 193-199, 2010.

DUC-GOIRAN P, MIGNOT TM, BOURGCOIS C, FERRÉ F. Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. **Eur. F. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**; 83: 85-100, 1999.

DURANT ST. Telomerase-Independent Paths to Immortality in Predictable Cancer Sub-types. **Journal of Cancer**, 3: 67-82, 2012.

FANG X, WONG S, MITCHELL BF. Effects of LPS and IL-6 on oxytocin receptor in non-pregnant and pregnant rat uterus. **Am J Reprod Immunol.**; 44: 65-72, 2000.

FITZGERALD JS, BUSCH S, WENGENMAYER T, DE LA MOTE T, POEHLMANN TG, MARKET UR. Signal transduction in trophoblast invasion. **Chem. Immunol. Allergy**, 88: 121-141, 2005.

FITZGERALD JS, POEHLMANN TG, SCHLEUSSNER E, MARKET UR. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT-3). **Hum. Reprod. Update**, 14: 335-344, 2008.

FOULADI-NASHTA AA, JONES CJ, NIJJAR N, MOHAMET L, SMITH A, CHAMBERS I, KIMBER SJ. Characterization of the uterine phenotype during the peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice. **Dev Biol.** 281(1): 1–21, 2005.

FUJISAWA K, NASUA K, ARIMA K, SUGANO T, NARAHARA H, MIYAKAWA I. Production of Interleukin (IL)-6 and IL-8 by a Choriocarcinoma Cell Line, BeWo. **Placenta.** 21: 354-360, 2000.

GARDNER JD, LEICHTY KW, CHRISTENSEN RD. Effect of interleukin-6 on fetal hematopoietic progenitors. **Blood,** 75: 2150-2155, 1990.

GERMAIN D & FRANK DA. Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy. **Clin. Cancer Res.** 13: 5665-5669, 2007.

GUTIERREZ G, SARTO A, BEROD L, CANELLADA A, GENTILE T, PASQUALINI S, MARGNI RA. Regulation of interleukin-6 fetoplacental levels could be involved in the protective effect of low-molecular weight heparin treatment on murine spontaneous abortion. **AJRI,** 51: 160, 165, 2004

HEINRICH PC, BEHRMANN I, MULLER-NEUEN G, SCHAPER F, GRAEVE L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp 130/Jak/STAT pathway. **Biochem. J.,** 334: 297-314, 1998.

HILL JA, POLGAR K, ANDERSON DJ. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. **JAMA.** 273:1933–1936, 1995.

HIRANO T, TAGA T, NAKANO N, YASUKAWA K, KASHIWAMURA S, SHIMIZU K, NAKAJIMA K, PYUN KH, KISHIMOTO T. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor(BCDF or BSFp-2). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** 85:54-90, 1985.

HIRANO T, NAKAJIMA K, HIBI M.. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. **Cytokine Growth Factor Rev.,** 8: 241- 252, 1997.

HUPPERTZ B, FRANK HG, KINGDOM JC, REISTER F, KAUFMANN P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. **Histochem Cell Biol.** 110(5):495-508, 1998.

IHLE JN. Cytokine receptor signaling. **Nature** 377: 591-594, 1995.

JASPER, M.J., TREMELLEN, K.P., ROBERTSON, S.A. Reduced expression of IL-6 and IL-1alpha mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. **J. Reprod. Immunol.** 73, 74-84, 2007.

JAUNIAUX E, GULBIS B, SCHANDENE L, COLLETTE J, HUSTIN J. Distribution of interleukin-6 in maternal and embryonic tissues during the first trimester. **Molec. Hum. Reprod.**, 2: 239-243, 1996.

KIM NW, PIETYSZEK MA, PROWSE KR, HARLEY CB, WEST MD, HO PLC, *ET AL.* Specific Association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science.** 266:2011-5, 1994.

KIM TK, MANIATIS T. Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. **Science** 273:1717-1719, 1996

KIPLING D, WYNFORD-THOMAS D, JONES CJ, AKBAR A, ASPINALL R, BACCHETTI S, BLASCO MA, BROCCOLI D, DEPINHO RA, EDWARDS DR, EFFROS RB, HARLEY CB, LANSDORP PM, LINSKENS MH, PROWSE KR, NEWBOLD RF, OLOVNIKOV AM, PARKINSON EK, PAWALEC G, PONTEN J, SHALL S, ZIJLMANS M, FARAGHER RG. Telomere-dependent senescence. **Nat. Biotechnol.**, 17: 313-314, 1999.

KISHIMOTO T. The biology of interleukin-6. **Blood**, 74: 1-10, 1989.

KISHIMOTO T, AKIRA S, TAGA T. Interleukin-6 and its receptor: A paradigm for cytokines. **Science**, 258-593, 1992.

KISHIMOTO T, AKIRA S, NARAZAKI M, TAGA T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. **Blood** 86: 1243-1254, 1995.

KOBEL M, POHL G, SCHMITT WD, HAUPTMANN S, WANG TL, SHIH IM. Activation of Mitogen-Activated protein kinase is required for migration and invasion of placental site trophoblastic tumor. **Am. J. Pathol.**, 167: 879-885, 2005.

KONG B, ISOZAKI T, SASAKI S. IL-6 antisense-mediated growth inhibition of a choriocarcinoma cell line: na intracellular autocrine growth mechanism. **Gynecol. Oncol.**, 63: 78-84, 1996.

KRUSE P F, MIEDEMA E. Production and Characterization of Multiple-Layered Populations of Animal Cells. **J. Cell Biol.**, 27: 273-279, 1965.

KYO S, TAKAKURA M, INOUE M. Telomerase activity in cancer as a diagnostic and therapeutic target. **Histol. Histopathol.**, 15: 813-824, 2000.

LAIRD SM, TUCKERMAN E, LI TC, BOLTON AE. Stimulation of human endodermal epithelial cell interleukin 6 production by interleukin 1 and placental protein 14. **Hum. Reprod.** 9: 1339-1343, 1994.

LAIRD SM, TUCKERMAN EM, DALTON CF, DUNPHY BC, LI TC, ZHANG X. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium presence in uterine flushings and production by cells in culture. **Hum. Reprod.** 12: 569-574, 1997.

LAIRD SM, TUCKERMAN EM, CORK BA, LI TC. Expression of nuclear factor kappa B in human endometrium: role in the control of interleukin-6 and leukaemia factor inhibitory factor production. **Mol. Hum. Reprod.**, 6: 34-40, 2000.

LAVELLE F, RIOU JF, LAOUI A, MAILLIET P. Telomerase: a therapeutic target for the third millennium? **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, 34: 111-126, 2000.

LEDUC K, BOURASSA V, ASSELIN E, LECLERC P, LAFOND J, REYES-MORENO J. Leukemia Inhibitory Factor Regulates Differentiation of Trophoblast-Like BeWo Cells Through the Activation of JAK/STAT and MAPK3/1 MAP Kinase-Signaling Pathways. **Biol Reprod.** 2011 Nov 2. [Epub ahead of print]: DOI:10.1095/biolreprod.111.094334.

LUNGI L, FERRETTI ME, MEDICI S, BIONDI C, VESCE F. Control of human trophoblast function. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, 5: 1-14, 2007.

LURAIN JR. Gestational trophoblastic tumors. **Semin. Surg. Oncol.** 6: 347-353, 1990.

LURAIN JR. Gestational trophoblastic disease I: epidemiology, pathology, clinical presentation and diagnosis of gestational trophoblastic disease, and management of hydatidiform mole. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 531-539, 2010

MARWOOD M, VISSER K, SALAMONSEN LA, DIMITRIADIS E. Interleukin-11 and leukemia inhibitory factor regulate the adhesion of endometrial epithelial cells: implications in fertility regulation. **Endocrinology** 150(6): 2915-23, 2009.

METCALF D. The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. **Stem Cells.** 21(1):5-14, 2003.

MORRISH DW, DAKOUR J, LI H. Functional regulation of human trophoblast differentiation. **J. Reprod. Immunol.**, 39: 179–195, 1998.

MOTRO B, ITIN A, SACHS L, KESHAT E. Pattern of interleukin-6 gene expression *in vivo* suggests a role for this cytokine in angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87: 3092-3096, 1990.

MUNOZ-SUANO, A., HAMILTON, A.B., BETZ, A.G. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol. Rev.* 241, 20–38, 2011.

NACHTIGALL MJ, KLIMAN HJ, FEINBERG RF, OLIVE DL, ENGIN O, ARICI A. The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation: a potential role in human implantation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 81: 801–806, 1996.

NAKA T, NARAZAKI M, HIRATA M, MATSUMOTO T, MINAMOTO S, AONO A, NICHIMOTO N, KAJITA T, YOSHIKAWA K, AKIRA S, KISHIMOTO T. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. **Nature**, 387: 924–929, 1997.

NISHINO E, MATSUZAKI N, MASUIRO K. Trophoblast-derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor on human trophoblast. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 71: 436-441, 1990.

NORWITZ ER, SCHUST DJ, FISHER SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. **N. Engl. J. Med.**, 245: 1400-1408, 2001.

PARADINAS FJ, ELSTON CW. **Gestational trophoblastic disease.** In Fox H. (ed.) Haines and Taylor: Obstetrical and Gynaecological Pathology. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003, pp 1359-1430.

PAULE B, CLERC D, RUDANT C, COULOMBEL C, BONHOMME-FAIVER L, QUILLARD J, BISSON M. Enhanced expression of interleukin-6 protein in bone and serum of metastatic renal cell carcinoma. **Hum Pathol.** 29:421–424, 1998.

PAULE B, BELOT J, RUDANT C, COULOMBEL C, ABBOU CC. The importance of IL-6 protein expression in primary human renal cell carcinoma: an immunohistochemical study. **J. Clin. Pathol.** 53: 388-390, 2000.

POEHLMANN TG, FITZGERALD JS, MEISSNER A, WENGENMAYER T, SCHLEUSSNER E, FRIEDRICH K, MARKERT UR. Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via STAT-3. **Placenta**, 26: S37-S41, 2005.

PRINS JR, LOPEZA NG, ROBERTSON SA. Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. **J. Reprod Immun.**, 95: 1–14, 2012

RAGHUPATHY R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunol Today**. 18: 478–482, 1997.

ROBERTS AW, ROBB L, RAKAR S, HARTLEY L, CLUSE L, NICOLA NA, METCALF D, HILTON DJ, ALEXANDER WS. Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. **Proc Natl Acad Sci USA** 98: 9324–9329, 2001.

ROSAI J. **Female reproductive system-placenta**. Ackerman's Surgical Pathology, 7<sup>th</sup> ed., vol. 2. St Louis: CV Mosby Company, 1989, pp. 1174-1192.

SALAMONSEN LA, DIMITRIADIS E, JONES RL, NILE G. Complex regulation of decidualization: a role for cytokines and proteases – a review. **Placenta**, 24: 76-85, 2003.

SALAMONSEN LA, NIE G, HANNAN NJ. Preparing fertile soil: the importance of endometrial receptivity. **Reprod Fertil Dev.**, 21(7): 923-34, 2009

SHARKEY AM, KING A, CLARK DE, BURROWS TD, JOKHI PP, CHARNOCK-JONES DS, LOKE YW, SMITH SK. Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy. **Biol. Reprod.**, 60: 355–364, 1999.

SHAY JW. Telomerase therapeutics: telomeres recognized as a DNA damage signal. **Clin Cancer Res.**; 9:3521–5, 2003.

SHAY, JW; WRIGHT, WE. Role of telomeres and telomerase in cancer. **Semin Cancer Biol.**, 21(6): 349–353, 2011.

SHEN Y, DEVGAN G, DARNELL JEJR, BROMBERG JF. Constitutively activated STAT-3 protects fibroblasts from serum withdrawal and UV-induced apoptosis and antagonizes the proapoptotic effects of activated Stat1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98: 1543–1548, 2001.

SHERWIN JR, SMITH SK, WILSON A, SHARKEY AM. Soluble gp 130 is up-regulated in the implantation window and shows altered secretion in patients with primary unexplained infertility. **J. Clin. Endocr. Metab.**, 87: 3953-3960, 2002.



SHIH IM, KURMAN RJ. The pathology of intermediate trophoblastic tumors and tumor-like lesions. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, 20: 31–47, 2001.

SHIMOMURA Y, ANDO H, FURUGORI K, KAJIYAMA H, SUZUKI M, IWASE A, MIZUTANI S, KIKKAWA F. Possible involvement of crosstalk cell-adhesion mechanism by endometrial CD26/dipeptidyl peptidase IV and embryonal fibronectin in human blastocyst implantation. **Mol Hum Reprod** 1;12(8): 491–5, 2006.

SMITH SK, CHARNOCK-JONES DS, SHARKEY AM. The role of leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 in human reproduction. **Hum. Reprod.**, 13: 237-243, 1998.

SONG MM, SHUAI K. The suppressors of cytokine signalling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. **J Biol Chem**; 273: 35056–62, 1998.

SOUNDARARAJAN R, RAO AJ. Trophoblast ‘pseudo-tumorigenesis’: Significance and contributory factors. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, 25: 2-15, 2004.

STARR R, WILSON TA, VINEY EM, MURRAY LJL, RAYNER JR, JENKINS BJ, GONDA TJ, ALEXANDER WS, METCALF D, NIVOLA NA, HILTON DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. **Nature**, 387: 917–921, 1997.

STAUM-RAM E, GLODMAN S, GABARIN D. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. **Reprod. Biol. Endocr.**, 2: 1-13, 2004.

STEWART CL, KASPAR P, BRUNET LJ, BHATT H, GADI I, KONTGEN F, ABBONDANZO SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. **Nature** 3; 359: 76–9, 1992.

SUTHERLAND A. Mechanisms of implantation in the mouse: Differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behaviour. **Develop Biol.**, 258: 241–251, 2003.

TABIBZADEH S, KONG QF, BABAKNIA A, MAY TA. Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. **Hum. Reprod.**, 10: 2793-2799, 1995.

TAGA T, KISHIMOTO T. Cytokine receptors and signal transduction. **FASEB J.** 6: 3387-3396, 1992.

TAKAHASHI Y, CARPINO N, CROSS JC, TORRES M, PARGANAS E, IHLE JN. SOCS3: An essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation. **EMBO Journal**, 22: 372–384, 2003.

TAKAHASHI U, TAKAHASHI M, CARPINO N, JOU ST, CHAO JR, TANAKA S, SHIGEYOSHI Y, PARGANAS E, IHLE JN. Leukemia Inhibitory Factor Regulates Trophoblast Giant Cell Differentiation via Janus Kinase 1-Signal Transducer and Activator of Transcription 3-Suppressor of Cytokine Signaling 3 Pathway. **Mol. Endocrinol.** 22(7): 1673-1681, 2008.

TAPIA A, SALAMONSEN LA, MANUELPILLAI U, DIMITRIADIS E. Leukemia inhibitory factor promotes human first trimester extravillous trophoblast adhesion to extracellular matrix and secretion of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2. **Hum. Reprod.**, 8: 1724-1732, 2008.

UZUMEU M, COSKUN S, JAROUDI K, HOLLANDERS JM. Effect of human chorionic gonadotropin on cytokine production from human endometrial cells *in vitro*. **Am. J. Reprod. Immunol.**, 40: 83-88, 1998.

WELLS M. The pathology of gestational trophoblastic disease: recent advances. **Pathology**, 39: 88-96, 2007.

WHITE CA, ZHANG JG, SALAMONSEN LA, BACA M, FAIRLIE WD, METCALF D, NICOLA NA, ROBB L, DIMITRIADIS E. Blocking LIF action in the uterus by using a PEGylated antagonist prevents implantation: a nonhormonal contraceptive strategy. **Proc Natl Acad Sci USA.**; 104(49):19357-62, 2007.

ZHANG YW, WANG LM, JOVE R, VANDE WOUDE GF. Requirement of STAT-3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. **Oncogene**, 21: 217–226, 2002.

## **ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

**Título do Projeto: EXPRESSÃO DOS FATORES LIF (FATOR INIBITÓRIO DE LEUCEMIA), IL-6 (INTERLEUCINA-6), STAT-3 (ATIVADOR DE TRANSCRIÇÃO-3) E TELOMERASE EM CORIOCARCINOMAS.**

Você está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa que tem como objetivo estudar o papel de algumas moléculas no desenvolvimento da placenta. Como sua gestação transcorreu normalmente até o momento, solicitamos sua autorização para colher um pequeno fragmento (biópsia) como referência de placenta normal, para depois compararmos estas com placentas alteradas.

Informamos que o presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, tendo como responsável direta pelo estudo a doutoranda Luciana Pietro, que poderá dar a você explicações adicionais sobre este estudo.

Caso você autorize, serão feitos os seguintes procedimentos:

- 3 a 6 horas após o parto, quando a sua placenta for descartada em embalagem especialmente destinada a este fim, serão colhidos uma amostra (biópsia) de 1cm<sup>3</sup> da mesma, com o auxílio de pinça e tesoura cirúrgicas descartáveis. Logo em seguida, o restante da placenta será descartado, de acordo com as regras desta maternidade.
- O material colhido será colocado em soro fisiológico e imediatamente transferido para o laboratório, onde será processado para avaliação das moléculas citadas anteriormente

As coletas e avaliações da placenta serão realizadas por profissionais da área da saúde previamente treinados. Não haverá armazenamento de material

biológico de qualquer espécie. Após análises dos dados, o material biológico será descartado.

Como o material será colhido somente horas após o parto, não haverá qualquer risco ou desconforto, de qualquer ordem, para você ou para seu bebê. Por outro lado, não haverá benefícios diretos para vocês, exceto a colaboração com um estudo que poderá trazer importantes informações sobre as diferenças no desenvolvimento de placentas normais e placentas alteradas.

É importante salientar que sua participação é totalmente voluntária e que você poderá retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízos de qualquer ordem, incluindo o seu atendimento obstétrico. As informações obtidas serão mantidas em sigilo e serão tratadas em conjunto, de modo que não haverá possibilidade de resgatar os seus dados particulares ou de qualquer outra participante.

Não haverá despesas pessoais para participar do estudo. Também não haverá retorno financeiro para sua participação.

Você poderá obter informações adicionais sobre esta pesquisa com as pesquisadoras abaixo:

Profa. Luciana Pietro: fone 3381-8263

Dra. Líliliana Andrade: fone 3289-3897

Dra Fátima Bottcher: fone 3521-9423.

Para reclamações ou informações de ordem ética, poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, tel. (19) 3521-8936.

---

Declaro que li cuidadosamente este documento, denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Declaro ainda fui esclarecida sobre os objetivos e procedimentos do estudo, e entendi que minha participação é totalmente voluntária, livre de ônus financeiro de qualquer parte. Fui informada que o material biológico colhido não será

armazenado, sendo, portanto, descartado após processamento e análise dos dados.

Este documento foi assinado em 2 vias, sendo que uma delas ficará comigo e a outra ficará com as pesquisadoras responsáveis.

Nome da participante:

\_\_\_\_\_

-----

Assinatura da participante

-----

Assinatura da pesquisadora ou associado

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_



CEP, 26/06/09.  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** Nº 368/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0282.0.146.000-09

### I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO:** “**EXPRESSÃO DOS FATORES LIF (FATOR INIBITÓRIO DE LEUCEMIA), IL-6 (INTERLEUCINA-6), STAT-3 (ATIVADOR DE TRANSCRIÇÃO 3) E TELOMERASE EM CORIOCARCINOMAS**”.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Fátima Aparecida Böttcher Luiz.

**INSTITUIÇÃO:** Hospital das Clínicas/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 07/05/2009

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 26/06/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

### II - OBJETIVOS

Estudar a expressão do fator inibitório de leucemia (LIF), da interleucina-6 (IL-6), do ativador de transcrição-3 (STAT-3) e da função da telomerase, visando compreender sua participação no processo de invasão do endométrio e na instalação das doenças de coriocarcinomas.

### III - SUMÁRIO

É um projeto de pesquisa regular. Pretende avaliar os níveis de expressão das moléculas citadas em material proveniente de linhagens celulares de coriocarcinomas e de placentas normais. Tais moléculas serão detectadas, localizadas e quantificadas através de ensaios imunohistoquímicos (IHQ), de Western Blotting (WB) e de Amplificação Repetida de Telomerase (TRAP). Os materiais biológicos para IHQ serão obtidos a partir de biópsias fixadas em formalina e mantidas em parafina, arquivadas no Departamento de Anatomia Patológica da UNICAMP. Serão selecionados 2 casos de biópsias de placenta não alterado e todos os casos de biópsias de coriocarcinomas arquivadas no período de janeiro de 2000 a novembro de 2008. Para as reações WB e TRAP, material a fresco será obtido a partir de linhagens celulares mantidas e cultivadas em laboratórios. Os resultados serão comparados, nas situações de doença e normalidade, através de análise semi-quantitativa para IHQ, processamento de imagens das reações de WB e TRAP, e subsequente comparação das frequências pelo teste qui-quadrado.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



## V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de maio de 2009.

  
**Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
VICE-PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM/UNICAMP



CEP, 26/03/13.  
(PARECER CEP: Nº 368/2009)

## PARECER

### I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “EXPRESSÃO DOS FATORES LIF (FATOR INIBITÓRIO DE LEUCEMIA), IL-6 (INTERLEUCINA-6), STAT-3 (ATIVADOR DE TRANSCRIÇÃO 3) E TELOMERASE EM CORIOCARCINOMAS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fátima Aparecida Böttcher Luiz

### II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprova o adendo que inclui 12 amostras (placentas normais a fresco e abortos em fase implantacional), bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

### III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de março de 2013.

**Dra. Mônica Jaques de Moraes**  
VICE-COORDENADORA do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP