

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: GINECOLOGIA E
OBSTETRÍCIA**



**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE TGF B1 EM PACIENTES COM
ADENOMIOSE**

ANDRÉIA JACOBO

Orientador: Prof. Dr. João Sabino da Cunha Filho

Porto Alegre, setembro de 2016.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: GINECOLOGIA E
OBSTETRÍCIA**



**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE TGF B1 EM PACIENTES COM
ADENOMIOSE**

Andréia Jacobo

**Orientador: Prof. Dr. João Sabino
da Cunha Filho**

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil.
2016

CIP - Catalogação na Publicação

Jacobo, Andréia
Expressão imuno-histoquímica de TGF B1 em
pacientes com adenomiose / Andréia Jacobo. -- 2016.
56 f.

Orientador: João Sabino da Cunha Filho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Adenomiose. 2. TGF B1. 3. Etiopatogenia. 4.
Imuno-histoquímica. I. da Cunha Filho, João Sabino,
orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Ao meu filho, Augusto.

Ao meu marido, Daniel.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Sabino da Cunha Filho, por me guiar e incentivar durante a realização deste trabalho.

À arquivista do Serviço de Patologia do HCPA, Carina, pelo empenho na separação do material para estudo.

Às pesquisadoras do Serviço de Patologia Experimental do HCPA, Emily e Flávia, pela disponibilidade, carinho e qualidade no trabalho realizado.

Ao meu filho Augusto, que desde sua vida intra-útero, esteve me acompanhando na busca pelo conhecimento.

Ao meu marido Daniel, pelo incentivo, carinho, amizade e compreensão.

À minha mãe Evanir, por tudo o que representa e faz por mim.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SIGLAS.....	7
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
REVISÃO DE LITERATURA	13
1. Estratégias para selecionar e localizar as informações.....	13
2. Marco conceitual	14
3. Definição	15
4. Epidemiologia	15
5. Manifestações clínicas.....	16
6. Diagnóstico.....	16
7. A zona juncional.....	18
8. Etiopatogenia.....	20
9. A superfamília TGF	22
9.1 TGF- β 1	24
10. Relação entre adenomiose e endometriose.....	26
JUSTIFICATIVA.....	29
HIPÓTESE NULA	30
OBJETIVOS.....	31
Objetivo Geral.....	31
Objetivos Específicos.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ARTIGO EM INGLÊS.....	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
PERSPECTIVAS	51
ANEXOS.....	52
Bula TGF β 1.....	52

ABREVIATURAS E SIGLAS

JZ: Zona juncional

RM: Ressonância magnética

USTV: Ultrassom transvaginal

EMI: interface endométrio-miométrio

OM: miométrio externo

ER: receptor de estradiol

Bcl-2: gene supressor de apoptose Bcl-2

TIAR: mecanismo de lesão e reparação tecidual

E2: estradiol

IL-1: Interleucina-1

COX-2: Cicloxigenase-2

PGE-2: Prostaglandina E2

STAR: proteína reguladora da esteroidogênese aguda

TGF: Transforming Growth Factor

TGF- β : Transforming Growth Factor β

TGF- β 1: Transforming Growth Factor β 1

TGF- β 2: Transforming Growth Factor β 2

TGF- β 3: Transforming Growth Factor β 3

BMP: Proteína morfogenética óssea

GDF: Fator de diferenciação do crescimento

AMH: Hormônio Anti-Mülleriano

ACVR1: Receptor ACV tipo 1

BMPR1A: Receptor BMP tipo 1A

ACVR1B: Receptor ACV tipo 1 B

TGFBR1: Receptor TGF B tipo 1

BMPR1B: Receptor BMP tipo 1B

ACVR1C: Receptor ACV tipo 1C

TGFBR2: Receptor TGF B tipo 2

AMHR2: Receptor AMH tipo2

ACVR2: Receptor ACV tipo 2

ACVR2B: Receptor ACV tipo 2B

BMPR2: Receptor BMP tipo 2

SGF: Fator de crescimento de sarcoma

TGF- α : Transforming Growth Factor α

EGF: Fator de crescimento epidérmico

LAP: Peptídeo associado a latência

R-SMADs: receptor-regulated SMADs

co-SMAD: common-mediator SMAD

EMT: Transição epitelial-mesenquimal

FMT: Transdiferenciação de fibroblasto para miofibroblasto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estratégia de busca de artigos científicos utilizando o PUBMED	13
Figura 2 - Imagens de adenomiose.	20

RESUMO

Introdução: Proteínas da Superfamília do fator transformador de crescimento β (TGF- β) estão implicadas na regulação de diversas funções biológicas. Embora alguns estudos revelaram a sua presença no endométrio ectópico de portadoras de adenomiose, a sua função na etiopatogenia da doença permanece pouco conhecida. **Objetivo:** o estudo visa comparar a expressão imuno-histoquímica de TGF- β 1 no endométrio ectópico de portadoras de adenomiose com o endométrio tópico de pacientes sem essa condição. **Método:** Estudo de caso-controle utilizando imuno-histoquímica em amostras uterinas (blocos de parafina) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A amostra contém 28 casos de adenomiose e 21 controles. **Resultados:** Não encontramos associação entre tabagismo e adenomiose ($P = 0,75$), abortos e adenomiose ($P = 0,29$), gestações e adenomiose ($P = 0,85$), curetagens e adenomiose ($P = 0,81$), dor pélvica e adenomiose ($P = 0,72$) e presença de mioma e adenomiose ($P = 0,15$). Além disso encontramos relação entre sangramento uterino anormal (SUA) e adenomiose ($P = 0,02$) e cesarianas prévias e adenomiose ($P = 0,02$). A expressão imuno-histoquímica de TGF- β 1 no endométrio ectópico de portadoras de adenomiose não teve diferença significativa quando comparado com a expressão dessa proteína no endométrio tópico de pacientes sem adenomiose ($P = 0,86$). **Conclusão:** Nosso estudo foi um dos primeiros a comparar a expressão de TGF- β 1 no endométrio de pacientes com e sem adenomiose. Em nossa análise não obtivemos diferença significativa entre os grupos, resultado diferente do encontrado em outros dois estudos. Mais estudos são necessários para investigar o papel da superfamília TGF no desenvolvimento e manutenção da adenomiose.

Palavras chave: adenomiose, TGF- β 1, etiopatogenia, imunohistoquímica

ABSTRACT

Background: Proteins of transforming growth factor β superfamily (TGF- β) are implicated in the regulation of various biological functions. Although some studies have revealed their presence in ectopic endometrium of women with adenomyosis, their role in the pathogenesis of the disease remains largely unknown. **Objective:** The study aims to compare the immunohistochemical expression of TGF- β 1 in ectopic endometrium of women with adenomyosis with the topic endometrium of patients without this condition. **Methods:** Case-control study using immunohistochemistry in uterine samples (paraffin blocks) obtained from Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The sample contained 28 adenomyosis cases and 21 controls. **Results:** We found no significant difference between smoking and adenomyosis ($P = 0.75$), abortions and adenomyosis ($P = 0.29$), pregnancies and adenomyosis ($P = 0.85$), curettage and adenomyosis ($P = 0.81$), pelvic pain and adenomyosis ($P = 0.72$) and presence of myoma and adenomyosis ($P = 0.15$). We did find a relationship between adenomyosis and abnormal uterine bleeding (AUB) ($P = 0.02$) and previous cesarean section and adenomyosis ($P = 0.02$). Immunohistochemical expression of TGF- β 1 in ectopic endometrium of women with adenomyosis did not have significant difference when compared with the expression of this protein in the topic endometrium of patients without adenomyosis ($P = 0.86$). **Conclusion:** Our study was one of the first to compare the TGF- β 1 expression in the endometrium of patients with and without adenomyosis. In our analysis we have not had significant difference between the groups, unlike observed in two other studies. More studies are needed to investigate the role of TGF superfamily in the development and maintenance of adenomyosis.

Key words: adenomyosis, TGF- β 1, pathogenesis, immunohistochemistry

INTRODUÇÃO

A adenomiose é uma doença benigna, caracterizada pela invasão de endométrio para dentro do miométrio, produzindo um aumento difuso do útero (1). Acomete pacientes no período reprodutivo, com prevalência que varia de 5 a 70%, conforme dados da literatura. Esta grande variação da prevalência é explicada pelo fato de a adenomiose ser diagnosticada muitas vezes pelo exame histopatológico, em peças de histerectomia de pacientes que foram submetidas à cirurgia por outros motivos (2,3). Os sintomas mais frequentes associados a doença são menorrágia, dismenorréia, dispareunia, dor pélvica crônica e infertilidade sendo que um terço das pacientes são assintomáticas (4,5,6). O diagnóstico da doença é firmado a partir da análise histopatológica do útero e mais modernamente através de exames de imagem como ressonância magnética e ultrassom transvaginal, onde pode-se identificar uma zona juncional alterada, heterogeneidade e distorções da ecotextura miometrial além de cistos miometriais (7). Nos últimos anos diferentes hipóteses patogênicas tem sido propostas para explicar o surgimento e desenvolvimento da adenomiose. Embora a doença seja hormônio sensível, o tratamento com progestogênicos é pouco eficaz e o uso de agonistas de GnRH é restrito a um curto período de tempo o que torna o tratamento da doença um desafio, sendo que a histerectomia ainda é o tratamento definitivo da doença (6,8). Embora os mecanismos propostos para a patogênese da doença sejam baseados em diferentes vias, alguns conceitos são comuns: a adenomiose é uma doença dependente de estrogênios e a interface miométrio endométrio ou zona juncional do útero (JZ) reconhecida como uma nova entidade anatômica e funcional na parede do útero, esteja provavelmente envolvida no seu desenvolvimento (9). Devido ao impacto da doença sobre a fertilidade e qualidade de vida das mulheres portadoras de adenomiose, a incerteza sobre sua origem, além da pobre resposta ao tratamento clínico, faz-se necessário continuado estudo sobre a patogênese e fisiopatologia da doença.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Estratégias para selecionar e localizar as informações

Foram realizadas buscas de artigos científicos no PUBMED utilizando as combinações de palavras-chave apresentadas na figura 1 abaixo:

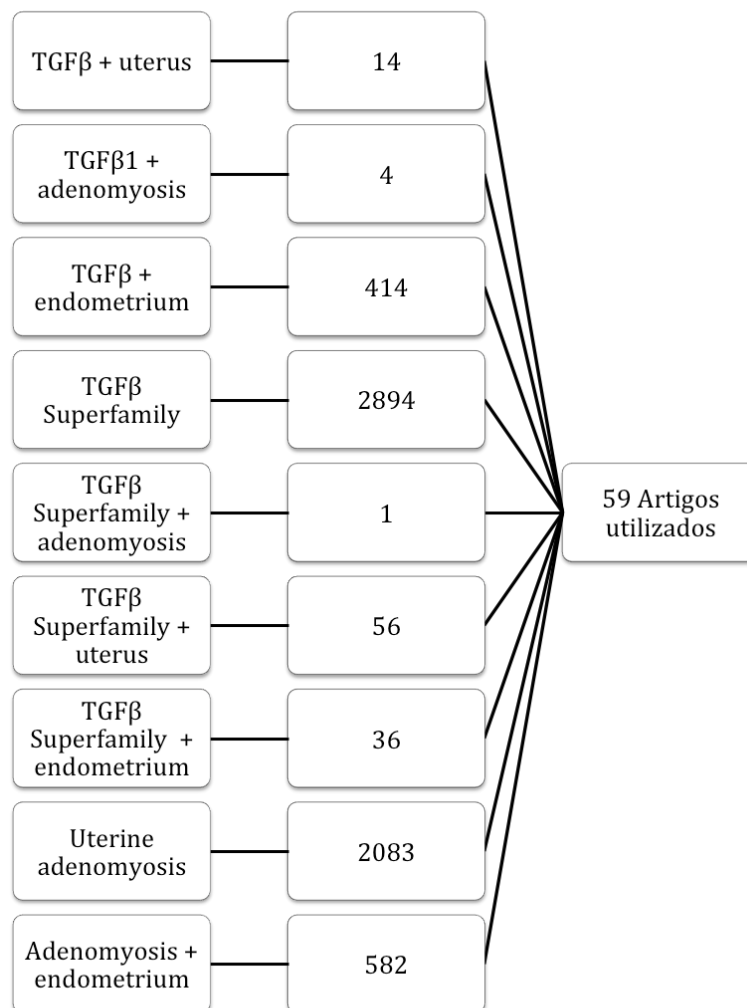


Figura1- Estratégia de busca de artigos científicos utilizando o PUBMED

2. Marco conceitual

O marco conceitual da dissertação é baseado na expressão imuno-histoquímica da proteína TGF- β 1. De acordo com nossa hipótese a expressão de TGF- β 1 está presente e pode estar aumentada no endométrio ectópico de pacientes com adenomiose e a exemplo da endometriose, apresenta papel importante na etiopatogenia da doença.

3. Definição

A primeira descrição da condição referida como adenomioma foi feita em 1860 pelo patologista alemão Carl Von Rokitansky, que encontrou glândulas endometriais no miométrio, ele as referiu como “cystosarcoma adenoids uterinum” (1). A definição moderna de adenomiose foi fornecida em 1972 por Bird, que afirmou: “Adenomiose pode ser definida como a invasão benigna de endométrio para dentro do miométrio, produzindo um aumento difuso do útero que microscopicamente exhibe glândulas endometriais e estroma ectópico, não neoplásico, circundado por miométrio hipertrófico e hiperplásico” (1,4).

4. Epidemiologia

A adenomiose é considerada uma doença benigna que afeta mulheres no período reprodutivo, porém com um impacto importante devido aos sintomas que a acompanha.

Em virtude de o diagnóstico da adenomiose ser feito por análise histológica, a incidência exata da doença não foi determinada. Em vários estudos, a prevalência relatada variou de 5% a 70%. A discrepância pode ser devido a muitos fatores, incluindo as várias classificações diagnósticas, diferenças no número de amostras de tecido avaliado e possível viés do patologista por causa da conscientização da história do paciente (1,3,10). Além disso, em um terço dos casos a adenomiose é uma doença assintomática que pode, ocasionalmente, ser diagnosticada por exames de imagem ou é encontrada em espécimes de histerectomia, realizada por outras razões médicas (2,3). Em geral, a frequência média de adenomiose na histerectomia é de aproximadamente 20% a 30% (10).

Setenta (70%) a oitenta por cento (80%) dos casos de adenomiose são encontrados em mulheres na quarta e quinta décadas de vida (3). Devido ao fato de o diagnóstico da adenomiose ser estabelecido por meio de análise histológica, a maior prevalência em mulheres mais velhas pode ser devido ao aumento da taxa de histerectomias nesta faixa

etária. No entanto, também pode ser devido à exposição a hormônios durante um longo tempo de vida, o que permite o desenvolvimento de sintomas. Cinco a 25% dos casos de adenomiose são observados em pacientes com menos de 39 anos, e apenas 5% a 10% ocorrem em mulheres com mais de 60 anos (5).

5. Manifestações clínicas

A Adenomiose não apresenta características clínicas patognomônicas. Os sintomas mais frequentes associados são menorragia (50%), dismenorréia (30%) e metrorragia (20%). A dispareunia, dor pélvica crônica e infertilidade também podem estar presentes (4,5,6), sintomas que também podem estar presentes em outras doenças.

A afecção frequentemente coexiste com outras doenças benignas como a endometriose (70%), leiomiomas (50%), hiperplasia endometrial (35%), pólipos endometriais (2%) e carcinomas endometriais (5).

Vários fatores de risco para a adenomiose foram estudados, no entanto, poucos estudos tiveram um bom delineamento e poder adequado para identificar aumentos moderados de risco relativo para o desenvolvimento da doença. Alguns fatores de risco associados ao desenvolvimento da adenomiose são idade, multiparidade OR=1,8 (IC 95% 0,9-3,4) para um nascimento e OR=3,1 (IC 95% 1,7-5,5) para mais do que dois nascimentos (11), cirurgias uterinas prévias OR=2,2 (IC 95% 1.4-4.0) (11), depressão e uso de antidepressivos (57.1% vs. 24.7%) (12) e uso de tamoxifeno (13,14). Evidências sobre a associação entre tabagismo e adenomiose são controversas (11).

6. Diagnóstico

O desenvolvimento de técnicas de imagem de alta resolução, particularmente a ressonância magnética (RM), melhorou o diagnóstico pré-operatório de adenomiose. Na RM

observa-se um espessamento difuso da zona juncional, com focos hiperintensos em imagens ponderadas em T2, margens mal definidas da zona juncional ou o seu espessamento (>12mm) (15). Além disso, tanto a RM quanto o ultrassom transvaginal (USTV) são valiosos para a caracterização da adenomiose pois podem identificar alterações na estrutura uterina que refletem mudanças histológicas. No USTV pode-se identificar aumento da ecogenicidade do miométrio, dilatação glandular ou cistos miometriais, má definição da zona juncional, aumento do útero com espessamento assimétrico de uma de suas paredes. No entanto o achado ao USTV mais preditivo de adenomiose é a presença de heterogeneidade do miométrio (7). Os primeiros a avaliar a acurácia do USTV e RM no diagnóstico de adenomiose e compará-los com os achados histológicos foram Reinhold et al. (1996). Eles relataram uma sensibilidade e especificidade de 89% para ambas as condições e concluíram que USTV foi tão preciso quanto RM (16). Bazot et al. (2001) também correlacionaram o diagnóstico por imagem (USTV e RM) da adenomiose com os achados histológicos e não encontraram nenhuma diferença na precisão entre USTV e RM, apesar de observarem uma menor sensibilidade na presença de miomas (17).

RM é uma modalidade confiável para o diagnóstico de adenomiose, com uma sensibilidade variando na literatura entre 78% a 88% em relação aos 53% a 89% para USTV e uma especificidade de 67 a 100% vs. 67 a 98% para USTV (18).

Histologicamente a adenomiose é diagnosticada quando a distância entre a borda inferior do endométrio e a área de miométrio afetada é mais da metade de um campo de baixa potência (2,5mm). Ao mesmo tempo, em peças de histerectomia de mulheres que tiveram parto normal, tecido endometrial pode ser encontrado no local da placentação prévia, penetrando mais que 2,5mm, portanto, basear a prevalência de adenomiose uterina somente em tal critério histológico, pode levar a superestimação do diagnóstico em mulheres múltiparas. Matalliotakis propôs duas maneiras de contornar esse problema. A primeira é

determinar a existência de hipertrofia miometrial em torno dos focos de adenomiose. Esta diferenciação não é vista na ZJ do miométrio. A segunda é a de medir a distância entre o endométrio e o foco de adenomiose mais próximo, esta deve ser superior a um terço da espessura do miométrio (19,20).

7. A zona juncional

A interface endométrio-miométrio (EMI), também conhecida como "zona de junção" ou "archimetra", foi descrita pela primeira vez em 1983 por Hricak et al. (21). A EMI é diferente do miométrio externo (OM) no que diz respeito à origem embrionária, estrutura, função e patologia. Embriologicamente, assim como o endométrio, a EMI é de origem Mülleriana, enquanto que o OM é de origem mesenquimal, não Mülleriana (22,23). Estruturalmente, a EMI representa o terço interior do miométrio, composto por feixes musculares mais curtos. O OM é representado pelos dois terços externos do miométrio predominantemente composto de fibras musculares mais longas. No entanto, na análise microscópica, todo o miométrio aparece como uma estrutura homogênea composta por células musculares lisas, os miócitos (22). Funcionalmente, a atividade contrátil no útero não grávido, um tipo de contração semelhante ao peristaltismo, é encontrada na EMI. O peristaltismo está envolvido no transporte do esperma, na regulação da implantação e hemostasia durante a menstruação (24). Portanto, a EMI desempenha um papel vital nas várias funções do útero não grávido, enquanto o OM é principalmente responsável pelo parto. Patologicamente, a EMI é a região mais comumente afetada na adenomiose e é caracterizada por irregularidade e espessamento (21,22,23,24). Contrações alteradas na EMI podem ser observadas na adenomiose incluindo hiperperistalse e peristaltismo anormal que podem ser responsáveis pelas manifestações clínicas associadas, tais como dismenorréia, metrorragia e infertilidade (24).

Apenas com o surgimento da RM que a camada interna do miométrio foi confirmada como sendo uma estrutura distinta, não só em termos da sua origem embrionária, mas também nas suas funções especializadas (10,25). É reconhecido que existem variações consideráveis de espessura e visibilidade da JZ entre os indivíduos, dependendo do estado hormonal (por exemplo, a menarca, menopausa, fase do ciclo menstrual, e uso de contraceptivos orais). Esta variabilidade torna difícil a definição da anatomia normal da ZJ na RM (26).

Em mulheres saudáveis em idade reprodutiva imagens uterinas ponderadas em T2 na RM exibem três camadas distintas, 1: a mucosa endometrial ou estrato mais interno, proporcionando um sinal de alta intensidade; 2: a área intermediária imediatamente subendometrial, dando um sinal de baixa intensidade e chamada de zona de junção do miométrio e 3: uma zona exterior que se estende por toda a extensão até a camada serosa do miométrio ou exterior, com uma intensidade de sinal médio (27).

Recentemente, uma classificação para adeniose foi proposta por Gordts et al. (28): hiperplasia simples da JZ (espessura da zona ≥ 8 mm e < 12 mm em imagens ponderadas em T2, em mulheres com idade entre 35 anos ou menos); adeniose parcial ou difusa (≥ 12 mm de espessura; foco miometrial com sinal de alta intensidade; envolvimento do miométrio externo: $< 1/3$, $< 2/3$, $> 2/3$) e adenomioma (massa miometrial com margens indistintas, principalmente com intensidade baixa do sinal em todas as sequências da RM). Esta classificação nunca foi discutida ou submetida a uma reunião de consenso e por isso, continua sem ser validada. O aumento da espessura da ZJ tem sido correlacionada com adeniose e uma espessura de 12mm ou mais é considerada padrão-ouro no diagnóstico não invasivo de adeniose uterina (29).Figura 2.

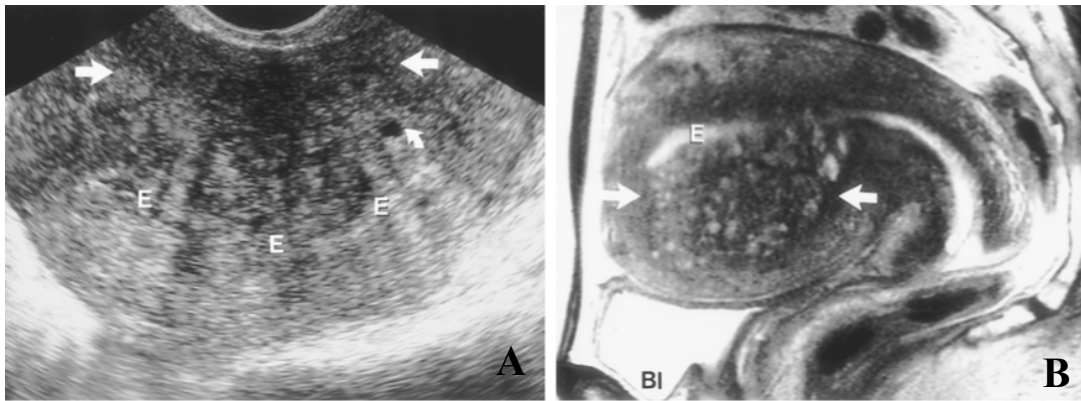


Figura 2 - Imagens de adenomiose. E=endométrio. (A) Imagem sagital oblíqua endovaginal nos mostra que o miométrio é engrossado ventralmente e tem uma ecotextura heterogênea (setas retas). A ecogenicidade do miométrio ventral é reduzida em relação àquela do miométrio dorsal. Características adicionais de adenomiose vistas nesta imagem incluem a má definição da junção endometriometrial e um cisto no miométrio (seta curva). (B) Correspondente imagem sagital ponderada em T2 na RM mostra marcado espessamento da zona de junção. O resultado é uma massa de baixa intensidade de sinal fracamente definida que substitui o miométrio ventral (setas). Os inúmeros focos luminosos, alguns dos quais têm uma aparência arredondada enquanto que outros têm uma cadeia linear ou com a aparência de dedo, representam o endométrio heterotópico. Fonte: Reinhold, C; 1996 (16).

8. Etiopatogenia

Nos últimos dez anos, diferentes hipóteses patogênicas têm sido propostas para explicar a iniciação e o desenvolvimento da doença. Seu entendimento é necessário não só para explicar a origem da adenomiose, mas também para esclarecer o seu impacto sobre a qualidade de vida e a fertilidade (9).

Embora os mecanismos propostos para a patogênese da doença sejam baseados em diferentes vias, alguns conceitos comuns podem ser explicados: adenomiose é uma doença dependente de estrogênio e a interface miométrio endométrio ou zona juncional do útero (JZ) reconhecida como uma nova entidade anatômica e funcional na parede do útero, está provavelmente envolvida no seu desenvolvimento (9).

A adenomiose pode se desenvolver a partir de uma transformação metaplásica dos restos embriológicos pluripotentes de Müller. Locais extrauterinos de adenomiose, tais como os observados no septo retovaginal, suportam o conceito de que alguns casos de adenomiose podem resultar desta causa etiológica. Além disso, os estudos sobre as propriedades

proliferativas e biológicas do endométrio ectópico e tópico mostram que adenomiose não responde às mesmas alterações hormonais encontrados no endométrio tópico (30).

A segunda hipótese, expressa por Bergeron et al. define adenomiose como uma invaginação do endométrio basal para o miométrio através de um JZ alterada ou ausente (31). A interface endometriometrial é o único tecido mucoso-muscular sem uma camada de tecido diferente interposta, e como resultado, o endométrio é justaposto em contato direto com o miométrio. Neste caso, o endométrio pode deslizar através de feixes de fibras musculares lisas fracas que perderam a sua coesão tecidual. O processo de invaginação intramiometrial e espalhamento pode ser facilitado pela atividade não-cíclica, anti-apoptótica da basal associados com estados hiperestrogênicos. A expressão de Receptor de estradiol (ER) nos focos de adenomiose é maior do que no endométrio normal e está associado com a expressão do produto do gene supressor de apoptose, Bcl-2, ao longo do ciclo menstrual. A co-expressão de Bcl-2 e ER e os estados hipermetabólicos estrogênicos podem promover tanto o processo de invaginação global como "espalhar" adenomiose no miométrio. Eles também podem promover outras doenças benignas como: endometriose, pólipos, hiperplasia endometrial e leiomiomas e esta é provavelmente a razão pela qual essas condições estão freqüentemente associadas com adenomiose (31,32).

Outra hipótese, expressa por Leyendecker et al. considera o hiperestrogenismo como o fator principal e a adenomiose como consequência do mecanismo de lesão e reparação tecidual (TIAR) (33). O útero é constantemente ativo durante todo o período reprodutivo da vida e assim, inevitavelmente sujeito a tensão mecânica. Os mecanismos moleculares associados com tensão mecânica, lesão e reparação exibem um padrão que é bastante semelhante em outros tecidos e envolve a expressão da aromatase P450 e a produção local de estrogênios (33,34). Mais especificamente, tem sido sugerido que a disfunção uterina nas mulheres com adenomiose pode ser o resultado de hiperestrogenismo local, enquanto os

níveis de estradiol periférico (E2) estão dentro do intervalo normal (35,36,37,38). O hiperestrogenismo local leva ao aumento da atividade peristáltica uterina do miométrio subendometrial, impondo tensão mecânica suprafisiológica sobre as células perto da rafe fundo-cornual. Este estado ativa o sistema TIAR focalmente com mais produção local de E2. O mecanismo de traumatização e cicatrização do tecido está associado com um processo fisiológico específico que envolve a produção local de interleucina-1 (IL-1). A IL-1 induz a ativação da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) resultando na produção de prostaglandina E2 (PGE2), que por sua vez ativa a proteína reguladora da esteroidogênese aguda (STAR) e a aromatase P450. Assim, com o aumento do colesterol para dentro da membrana mitocondrial, a testosterona pode ser formada e aromatizada em estradiol (E2), que exerce o seu efeito proliferativo e de cicatrização através do ER2 (33,39,40). Com uma atividade hiperperistáltica contínua e sustentação da lesão, a cicatrização não seguirá e um número crescente de focos tendem a ser envolvidos neste processo de lesão crônica, proliferação, e inflamação. A expansão e o desenvolvimento desses locais faz com que áreas focais do endométrio basal funcionem como uma glândula endócrina, que produz E2. A produção focal de estrogênio pode atingir um nível no tecido que, de um modo parácrino, aumenta a atividade uterina peristáltica presumivelmente mediada pela ocitocina endometrial e o seu receptor, criando um círculo vicioso que autoperpetua esse processo.

9. A superfamília TGF

A superfamília do fator de crescimento transformante β (TGF- β) é uma grande família de proteínas segregadas em mamíferos, que engloba as sub-famílias TGF- β s, ativinas, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e fatores de diferenciação do crescimento (GDF), hormônio Antimulleriano e fator de diferenciação de crescimento nodal (NODAL). No geral, esta superfamília de proteínas exibe diversidade funcional, desempenhando importante papel

em processos fisiológicos e patológicos. Apresentam papéis biológicos na diferenciação celular, proliferação, apoptose e remodelação do tecido, todas consistentes com vários processos reprodutivos (41).

Os membros da superfamília TGF promovem suas respostas biológicas ligando-se a serina/treonina quinase transmembrana conhecidas como receptores da superfamília TGF. Com base nas suas propriedades estruturais e funcionais, os receptores de TGF- β são divididos em duas subfamílias: receptores do tipo I e do tipo II. Esses receptores são glicoproteínas de aproximadamente 55 kDa e 70 KDa, respectivamente que interagem após a ligação com o ligante e ativam uma sinalização intracelular mediada pelas proteínas SMADs (42,43).

Embora mais de 40 membros da família TGF- β tenham sido descobertos até a data, há apenas sete receptores do tipo 1 (ACVRL1, ACVR1, BMPR1A, ACVR1B, TGFBR1, BMPR1B, ACVR1C) e cinco receptores do tipo 2 (TGFBR2, AMHR2, ACVR2, ACVR2B e BMPR2) em mamíferos (42,44).

Cada ligante tem afinidade com receptores específicos do tipo I e do tipo II, que propagam a sinalização através da fosforilação de um conjunto de proteínas SMADs no citoplasma.

O endométrio humano passa por ciclos notáveis de remodelação, envolvendo proliferação, diferenciação e várias reparações a cada 28 dias. Esta atividade cíclica é regulada por esteróides ovarianos, estrogênio e progesterona, mas a um nível parácrino por uma miríade de fatores de crescimento, citocinas e proteases. Membros da superfamília do fator transformador de crescimento β são abundante e dinamicamente expressos no endométrio e aparecem, através de suas ações associadas com a proliferação celular, diferenciação, apoptose e remodelação dos tecidos e tem papéis fundamentais na modulação

de eventos celulares envolvidos na menstruação, proliferação, decidualização e estabelecimento da gravidez (41).

9.1 TGF- β 1

Os polipeptídeos da família TGF- β foram isolados pela primeira vez por De Larco e Todaro, no final da década de 1970, como um grupo de compostos denominados por eles de fator de crescimento de sarcoma (SGF): compostos capazes de causar a transformação maligna de fibroblastos de rim de ratos. Somente estudos adicionais mostraram que SGF é uma mistura de dois compostos diferentes, caracterizados por propriedades diferentes, chamadas fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) da família do fator de crescimento epidérmico (EGF) (45). Nos mamíferos existem três isoformas de TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. As isoformas compartilham homologia em cerca de 70% na sequência de aminoácidos, porém cada uma das isoformas é codificada por genes que têm locais diferentes em vários cromossomas, assim descritos: TGF- β 1 no braço longo do cromossoma 19 (19q13.1), TGF- β 2 no braço longo do cromossoma 1 (1q41) e TGF- β 3 no braço longo do cromossoma 14 (14q24) (41,45).

TGFs são traduzidas como precursores pré-propeptídeo com um peptídeo de sinal N-terminal seguido pelo prodomínio e domínio maduro. Seis a nove resíduos de cisteína conservados no domínio maduro formam ligações dissulfureto intra e intermoleculares característicos desta família de proteínas (42). Muitos membros da superfamília TGF são expressos no endométrio em diferentes fases do ciclo.

As três isoformas de TGF- β são expressas no endométrio humano com predomínio de TGF- β 2 localizada no estroma, enquanto TGF- β 1 e TGF- β 3 estão presentes tanto nas células estromais como nas células epiteliais (41, 46).

TGF- β 1 é inicialmente sintetizada sob a forma de um complexo latente, o pré-pro TGF- β , um monômero de peso molecular de 55 kDa que consiste em 390 resíduos de aminoácidos no total, incluindo o peptídeo de sinal N-terminal (SP) de 29 aminoácidos, uma proregion de 249 aminoácidos denominado peptídeo associado a latência (LAP), e uma sequência C-terminal de 112 aminoácidos formando a forma ativa real do TGF- β após modificações relevantes (45). A forma latente é incapaz de interagir com seu receptor, portanto é biologicamente inativa. A atividade do domínio maduro do ligante a TGF é mascarado pelo pró-peptídeo, LAP (peptídeo associado a latência), que é clivado a partir do domínio maduro por uma endoproteinase tipo furina durante a secreção, mas permanece associado com o domínio maduro através de interações não covalentes. A dissociação do LAP libera TGF- β 1 como um proteína homodimérica ativa, que consiste em duas cadeias polipeptídicas, cada uma contendo 112 resíduos de aminoácidos, ligados por uma ligação dissulfureto e formando um complexo com um peso molecular total de 25 kDa. (41,42,45,46).

A ação do TGF se inicia com a sua ligação ao seu receptor tipo II específico, T β RII, o qual fosforila e ativa o receptor tipo I, T β RI. O receptor tipo I propaga a sinalização através da ativação e fosforilação de proteínas citoplasmáticas da família de SMADs conhecidas como receptor-regulated SMADs (R-SMADs), SMAD2 e SMAD3. A fosforilação de R-SMADs permite a sua interação com common- mediator SMAD (co-SMAD), SMAD4, formando um complexo capaz de atingir no núcleo, onde irão modular a transcrição de genes-alvos (44,46).

Conforme a literatura, a expressão de RNAm TGF- β 1 no endométrio, está significativamente aumentada nas fases secretora média, tardia e menstrual em comparação com as fases proliferativas e secretora inicial, esse padrão implica na sua dependência de progesterona (47,48). Também em estudo in vitro, o teor de RNAm TGF- β 1 em explantes de tecido endometrial obtidos na fase proliferativa foi significativamente aumentada após

estimulação durante 4 dias com estradiol + progesterona (48), reforçando a idéia do aumento da expressão dessa citocina pela ação de esteróides sexuais.

10. Relação entre adenomiose e endometriose

A endometriose é uma doença ginecológica benigna, muitas vezes associada à infertilidade e dor pélvica que ocorre em mulheres em idade reprodutiva. A doença é caracterizada pelo crescimento de tecido endometrial em locais fora da cavidade endometrial. Embora pouco se saiba sobre sua etiologia e patogênese, acredita-se que a menstruação retrógrada com subsequente implantação e crescimento de células endometriais viáveis tenha papel importante na etiologia da doença. Há também evidências crescentes de que as células mesoteliais presentes na cavidade peritoneal podem também contribuir para o desenvolvimento e manutenção da endometriose peritoneal (49,50,51). Estudos tem demonstrado que as células mesoteliais proporcionam uma superfície para as células endometriais ectópicas se anexar, além de facilitar a invasão de células endometriais ectópicas através da remodelação tissular e ou através de alterações da morfologia das células mesoteliais (52). A morfologia do endométrio eutópico de mulheres com endometriose é semelhante ao endométrio normal, mas a sua fisiologia e bioquímica são diferentes. Existem evidências indicando que o endométrio de mulheres com endometriose tem uma maior capacidade de proliferar e, por conseguinte se implantar e crescer na cavidade peritoneal (52).

Vários investigadores relataram um elevado grau de associação entre endometriose e adenomiose, embora a incidência de endometriose em mulheres com adenomiose ainda não seja conhecida. Um estudo publicado por Bazot et al. mostrou que 79% das mulheres com endometriose tem adenomiose concomitante (53).

Embora adenomiose e endometriose sejam doenças diferentes, ambas crescem e regredem de forma dependente de estrogênio. Polimorfismos no gene do receptor de

estrogênio alfa estão associados com um risco de adenomiose. As lesões de adenomiose contêm receptores de esteróides, bem como enzimas aromatase e sulfatase. Juntamente com o estrogênio em circulação, os estrogênios produzidos localmente estimulam o crescimento de tecido, mediado pelos receptores de estrogênio. O metabolismo do estrogênio, incluindo o padrão de expressão da aromatase e a regulação da 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 é modificada no endométrio eutópico de mulheres com endometriose, adenomiose, e / ou leiomiomas em comparação com o endométrio eutópico das mulheres sem doença (54). Além disso, há evidências crescentes de que uma alteração na sinalização do TGF- β pode desempenhar um papel na etiologia da endometriose. Alguns estudos mostraram que mulheres com endometriose tem aumento dos níveis de TGF- β no seu fluido peritoneal e soro, quando comparadas com mulheres sem doença e esses níveis parecem mudar ao longo do ciclo menstrual (55,56,57).

Existe na literatura, até o momento, dois estudos que avaliaram a expressão de TGF- β 1 em pacientes com adenomiose. Em um estudo que avaliou a expressão de citocinas na cavidade endometrial, através de lavados, observou que em úteros com leiomioma e adenomiose, os níveis de TGF- β 1 foram significativamente mais elevados em comparação com o grupo controle (58). Em outro estudo publicado recentemente, foi avaliado os níveis de expressão das proteínas TGF- β 1 e p-Smad3 em células estromais de endométrio ectópico e endométrio controle e encontraram níveis de expressão de proteínas TGF- β 1 e p-Smad3 significativamente mais elevados no estroma de células adenomióticas do que no estroma de células de endométrio normal (ambos valores $P < 0,001$) (8). Os pesquisadores postularam que como na endometriose, as lesões de adenomiose mostram um aumento significativo da agregação de plaquetas, aumento da expressão de TGF- β 1, Smad3 fosforilada, marcadores de transição epitelial-mesenquimal (EMT), transdiferenciação de fibroblasto para miofibroblasto (FMT) e metaplasia do músculo liso (SMM), e essa conjunção leva ao aumento da fibrose em

comparação com o endométrio normal. Neste estudo, para a análise da expressão de TGF- β 1 foi utilizada a técnica de imuno-histoquímica, como no nosso estudo, porém o endométrio controle foi coletado de pacientes que foram submetidas à cirurgias para tratamento de patologias ovarianas e cervicais.

JUSTIFICATIVA

Além da sua alta prevalência, a adenomiose apresenta importante impacto na qualidade de vida e na fertilidade das pacientes portadoras da doença. Os tratamentos disponíveis até o momento apresentam uma baixa resposta, sendo que alguns podem ser utilizados por um curto período de tempo, com retorno dos sintomas após a sua descontinuação o que torna o manejo da doença um grande desafio e a histerectomia acaba sendo o tratamento definitivo. Diversos estudos tem procurado elucidar a etiopatogenia da adenomiose, porém, até o momento ela permanece bastante obscura com algumas evidências apontando para uma anormalidade na invasão celular. Neste contexto, estamos propondo um estudo original para avaliar o papel da via do TGF- β 1 neste grupo de mulheres.

HIPÓTESE NULA

O endométrio ectópico não apresenta alteração da expressão imuno-histoquímica de TGF- β 1.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estabelecer se há diferença na expressão imuno-histoquímica de TGF- β 1 entre endométrio ectópico de pacientes com adenomiose e o endométrio tópico de pacientes sem adenomiose.

Objetivos Específicos

Determinar a taxa de positividade imuno-histoquímica de TGF- β 1 no endométrio ectópico de pacientes com adenomiose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Benagiano G, Brosens I. History of adenomyosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2006 Aug; 20(4):449-63.
2. Parker JD, Leondires M, Sinaii N, et al. Persistence of dysmenorrhea and nonmenstrual pain after optimal endometriosis surgery may indicate adenomyosis. *Fertil Steril*. 2006 Sep; 86(3):711-5.
3. Azziz R. Adenomyosis: Current perspectives. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1989 Mar; 16(1): 221-35.
4. Bird CC, McElin TW, Manalo Estrella P. The elusive adenomyosis of the uterus revisited. *Am J Obstet Gynecol*. 1972 Mar; 112(5):583-93.
5. Benson RC, Sneed VD. Adenomyosis: a reappraisal of symptomatology. *Am J Obstet Gynecol* 1958 Nov; 76(5): 1044-57.
6. Grow DR, Filer RB. Treatment of adenomyosis with long-term GnRh analogues: a case report. *Obstet Gynecol*. 1991 Sep; 78(3 Pt 2):538-9.
7. Garcia L, Isaacson K. Adenomyosis: review of the literature. *J Minim Invasive Gynecol* 2011 Jul-Aug; 18(4): 428-37.
8. Xishi L, Minhong S, Qiuming Q, Hongqi Z, Sun-Wei G. Corroborating evidence for platelet induced epithelial-mesenchymal transition and fibroblast to myofibroblast transdifferentiation in the development of adenomyosis. *Hum Reprod*. 2016; 31(4):734-49.
9. Brosens I, Derwig I, Brosens J, Fusi L, Benagiano G, Pijnenborg R. The enigmatic uterine junctional zone: the missing link between reproductive disorders and major obstetrical disorders? *Hum Reprod* 2010; 25(3): 569-74.
10. Bergholt T, Eriksen L, Berendt N, Jacobsen M, Hertz JB. Prevalence and risk factors of adenomyosis at hysterectomy. *Hum Reprod*. 2001 Nov; 16(11):2418-21.
11. Parazzini F, Vercellini P, Panazza S, Chatenould L, Oldani S, Crosignani PG. Risk factors for adenomyosis. *Hum Reprod*. 1997 Jun; 12(6):1275-9.
12. Taran FA, Weaver AL, Coddington CC et al. Understanding adenomyosis: a case control study. *Fertil Steril*. 2010 Sep; 94(4):1223-8.
13. Taran FA, Stewart EA, Brucker S. Adenomyosis: epidemiology, risk factors, clinical phenotype and surgical and interventional alternatives to hysterectomy. *Geburtsh Frauenheilk*. 2013 Sep; 73(9): 924-31.

14. Cohen I, Beyth Y, Tepper R. et al. Adenomyosis in postmenopausal breast cancer patients treated with tamoxifen: a new entity? *Gynecol Oncol.* 1995 Jul; 58(1):86-91. [PubMed]
15. Gordts S, Brosens JJ, Fusi L et al. Uterine adenomyosis: a need for uniform terminology and consensus classification. *Reprod Biomed Online* 2008 Aug; 17(2): 244-8.
16. Reinhold C, McCarthy S, Bret PM, Mehio A, Atri M, Zakarian R, Glaude Y, Liang L, Seymour RJ. Diffuse adenomyosis: Comparison of endovaginal US and MR imaging with histopathologic correlation. *Radiology.* 1996 Apr;199(1):151-8.
17. Bazot M, Cortez A, Darai E, Rouger J, Chopier J, Antoine J-M, Uzan S. Ultrasonography compared with magnetic resonance imaging for the diagnosis of adenomyosis: correlation with histopathology. *Hum Reprod* 2001 Nov; 16(11):2427-33.
18. Reinhold C, Tafazoli F, Mehio A et al. Uterine adenomyosis: endovaginal US and MR imaging features with histopathologic correlation. *Radiographics* 1999 Oct; 19: S147-160.
19. Matalliotakis IM, Kourtis AI, Panidis DK. Adenomyosis. *Obstet Gynecol Clinics of North America* 2003;30:63-82.
20. Matalliotakis I, Cakmak H, Dermitzaki D, Zervoudis S, Goumenou A, Fragouli Y. Increased rate of endometriosis and spontaneous abortion in an in vitro fertilization program: no correlation with epidemiological factors. *Gynecol Endocrinol* 2008 Apr; 24(4):194-8.
21. Hricak H, Alpers C, Crooks LE, Sheldon PE. Magnetic resonance imaging of the female pelvis: initial experience. *AJR Am J Roentgenol.* 1983 Dec;141(6):1119-28. [PubMed]
22. Fusi L, Cloke B, Brosens JJ. The uterine junctional zone. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2006 Aug; 20(4):479-91. [PubMed]
23. Brosens JJ, Barker FG, De Souza NM. Myometrial zonal differentiation and uterine junctional zone hyperplasia in the non-pregnant uterus. *Hum Reprod Update.* 1998 Sep-Oct; 4(5):496-502. [PubMed]
24. Zhang Y, Zhou L, Li CT, Duan H, Yu P, Wang HY. Ultrastructural features of endometrial-myometrial interface and its alterations in adenomyosis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Mar;7(4):1469-77.
25. Brosens JJ, De Souza NM, Barker FG Uterine junctional zone: Function and disease *Lancet.* 1995 Aug; 346(8974):558-60.
26. Brown HK, Stoll BS, Nicosia SV, Fiorica JV, Hambley PS, Clarke LP, Silbiger ML. Uterine junctional zone: correlation between histologic findings and MR imaging. *Radiology.* 1991 May;179(2):409-13.
27. Tamai K, Koyama T, Umeoka S, Saga T, Fujii S, Togashi K. Spectrum of MR features in adenomyosis. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology.* 2006 Aug; 20(4):583-602.

28. Gordts S, Brosens JJ, Fusi L, Benagiano G, Brosens I. Uterine adenomyosis: a need for uniform terminology and consensus classification. *Reprod Biomed Online*. 2008 Aug; 17(2):244-8.
29. Reinhold C, McCarthy S, Bret PM, Mehio A, Atri M, Zakarian R, Glaude Y, Liang L, Seymour RJ. Diffuse adenomyosis: Comparison of endovaginal US and MR imaging with histopathologic correlation. *Radiology*. 1996 Apr;199(1):151-8.
30. Matsumoto Y, Iwasaka T, Yamasaki F, Sugimori H. Apoptosis and Ki-67 expression in adenomyotic lesions and in the corresponding eutopic endometrium. *Obstet Gynecol* 1999 Jul; 94(1): 71-7.
31. Bergeron C, Amant F, Ferenczy A. Pathology and physiology of adenomyosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006 Aug; 20(4): 511-21.
32. Ferenczy A, Bronsen I. Pathophysiology of adenomyosis. *Hum Reprod Update*. 1998 Jul-Aug; 4(4):312-22.
33. Leyendecker G, Wildt L, Mall G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. *Arch Gynecol Obstet* 2009 Oct; 280(4): 529-38.
34. Garcia-Segura LM. Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *J Neuroendocrinol* 2008 Jul; 20(6):705-12.
35. Leyendecker G, Kunz G, Kissler S, Wildt L. Adenomyosis and reproduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2006 Aug; 20(4): 523-46.
36. Kunz G, Noe M, Herbertz M, Leyendecker G. Uterine peristalsis during the follicular phase of the menstrual cycle. Effects of oestrogen, antioestrogen and oxytocin. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 647-654
37. Urabe M, Yamamoto T, Kitawaki J, Honjo H, Okada H. Estrogen biosynthesis in human uterine adenomyosis. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1989 Aug; 121(2):259-64.
38. Yamamoto T, Noguchi T, Tamura T, Kitawaki J, Okada H. Evidence for estrogen synthesis in adenomyotic tissues. *Am J Obstet Gynecol*. 1993 Sep; 169(3):734-8.
39. Yang G, Im HJ, Wang JH. Repetitive mechanical stretching modulates IL-1 beta induced COX-2, MMP-1 expression, and PGE2 production in human patellar tendon fibroblasts. *Gene* 2005 Dec; 19(363):166-172.
40. Hadjiargyrou M, Ahrens W, Rubin CT. Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair. *J Bone Miner Res*. 2000 Jun; 15(6): 1014-23.
41. Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction*. 2006 Aug;132(2):217-32.

42. Qinglei L, Julio EA, Mark AE, Ankur KN, Takashi N, Martin MM. Transforming growth factor β receptor type 1 is essential for female reproductive tract integrity and function. *PLoS Genet*. 2011 Oct; 7(10):e1002320.
43. Hua C, Chester WB, Martin MM. Genetic Analysis of the mammalian transforming growth factor-superfamily. *Endocrine Reviews*. 2002;23(6):787-823.
44. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:753-91.
45. Poniatowski LA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D. Transforming growth factor beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015:137823.
46. Kimura ET, Matsuo ES, Ricarte Filho JE. TGFB, Ativina e sinalização SMAD em câncer de Tireóide. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2007 Jul;51(5).
47. Casslén B, Sandberg T, Gustavsson B, Willén R, Nilbert M. Transforming growth factor beta 1 in the human endometrium. Cyclic variation, increased expression by estradiol and progesterone, and regulation of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1. *Biol Reprod*. 1988 Jun; 58(6):1343-50.
48. Itoh H, Kishore AH, Lindqvist A, Rogers DE, Word RN. Transforming Growth Factor β 1 (TGF β 1) and Progesterone Regulate Matrix Metalloproteinases (MMP) in Human Endometrial Stromal Cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Mar; 97(6): 888-97.
49. Johnson MC, Torres M, Alves A, Bacallao K, Fuentes A, Vega M et al. Augmented cell survival in ectopic endometrium from women with endometriosis: Expression of c-myc, TGF-beta 1 and tax genes. *Reprod Biol Endocrinology*. 2005 Sep; 3:45.
50. Wigfield, M, Macpherson A, Healy, DL, Rogers PA. Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1995 Aug; 64(2): 340-6.
51. Young VJ, Brown JK, Saunders PT, Horne AW. The role of the peritoneum in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2013 Sep-Oct; 19(5):558-69.[PubMed]
52. Young VJ, Brown JK, Saunders PT, Duncan WC, Horne AW. The peritoneum is both a source and target of TGF- β in women with endometriosis. *PLoS One*. 2014 Sep; 9(9): e106773.[PubMed]
53. Kunz G, Beil D, Huppert P, Noe M, Kissler S, Leyendecker G. Adenomyosis in endometriosis: prevalence and impact on fertility. Evidence from magnetic resonance imaging. *Hum Reprod*. 2005 Aug; 20(8):2309-16.
54. Kitawaki J. Adenomyosis: the pathophysiology of an estrogen-dependent disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006 Aug; 20(4):493-502.
55. Pizzo A, Salmeri FM, Ardita FV, Sofob V, Tripepi M, et al. Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*. 2002; 54(2): 82–87. [PubMed]

56. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koninckx PR. Transforming growth factor- β activity is increased in peritoneal fluid from women with endometriosis. *Obstet Gynecol*. 1994 Feb; 83(2):287-292.
57. Küpker W, Schultze-Mosgau A, Diedrich K. Paracrine changes in the peritoneal environment of women with endometriosis. *Human Reprod Update*. 1998;4(5):719-723.
58. Inagaki N, Ung L, Otani T, Wilkinson D, Lopata A. Uterine cavity matrix metalloproteinases and cytokines in patients with leiomyoma, adenomyosis or endometrial polyp. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003 Dec; 111(2):197-203.

ARTIGO EM INGLÊS

TGF- β 1 expression in patients with adenomyosis

A ser submetido à Fertility and Sterility

TGF-β1 expression in patients with adenomyosis

ABSTRACT

The identification of differences between topic and ectopic endometria of women with adenomyosis may be important to our understanding of their etiology. Transforming growth factor-β (TGF-β) is abundantly and dynamically expressed in the endometrium and performs actions associated with cell proliferation, differentiation, apoptosis, and tissue remodeling. Little is known about TGF-β expression in the ectopic endometrium of patients with adenomyosis and its role in the disease's pathogenesis. This study aims to compare the expression of this growth factor in patients with and without adenomyosis. **Methods:** This work was a case-control study using immunohistochemistry to evaluate the difference in TGF-β1 expression, performed on anatomopathological samples (paraffin blocks) from patients with and without adenomyosis, the sample contained 28 adenomyosis cases and 21 controls. Clinical data were collected from medical records. Student *t* and multivariate logistic regression tests were used for statistical analysis. Associations were considered significant at $P < 0.05$. **Results:** We found no significant association between smoking and adenomyosis ($P = 0.75$), abortions and adenomyosis ($P = 0.29$), pregnancies and adenomyosis ($P = 0.85$), curettage and adenomyosis ($P = 0.81$), pelvic pain and adenomyosis ($P = 0.72$) and mioma and adenomyosis ($P = 0,15$). We did find a relationship between adenomyosis and abnormal uterine bleeding (AUB) ($P = 0.02$) and previous cesarean section and adenomyosis ($P = 0.02$). The mean TGF-β1 intensity (mean \pm SD) in the ectopic endometrium of women with adenomyosis showed no significant association (184.17 ± 9.4 vs. 184.66 ± 16.08 , $P = 0.86$) from the topic endometrium of women without adenomyosis. **Conclusion:** TGF-β1 expression is not increased in the ectopic endometrium of women with adenomyosis.

Keywords: adenomyosis, TGF-β1, etiopathogenesis, immunohistochemistry

Introduction

Adenomyosis is a common gynecological disease; its prevalence varies in the literature from 5 to 70% in symptomatic women, with a mean frequency of 20 to 30% in hysterectomy specimens (1). The symptoms associated with the disease are menorrhagia, dysmenorrhea, and metrorrhagia, and one-third of patients are asymptomatic (2,3). Hysterectomy is the treatment of choice for the disease because clinical treatment yields poor results and high recidivism rates after discontinuation (4,5).

The topic and ectopic endometria of women with adenomyosis has shown a number of metabolic and molecular changes that increase angiogenesis and proliferation, decrease apoptosis, allow local estrogen production, create progesterone resistance, and undermine cytokine expression. These changes increase the endometrium's ability to infiltrate the myometrial junctional zone and facilitate the growth of ectopic tissue. Furthermore, several immunological abnormalities have been observed in these individuals, together with an increase in "free radical" production, which leads to overgrowth of endometrial stromal cells. This process may facilitate the establishment of adenomyosis (6). Metabolic and molecular abnormalities have also been observed that are often similar to those observed in endometriosis, where there is abnormal gene expression, local production of estrogen with an altered endometrial response to progesterone and an increase in nerve density and oxidative stress (7).

Transforming growth factor β (TGF- β) is abundantly expressed in the endometrium and is secreted by the endometrial cells and macrophages into the uterine fluid, where its interactions with pre-embryonic implantation are suspected (8). TGF- β secretion in the peritoneal fluid of women suffering from endometriosis suggests that it may be critical in the establishment and/or maintenance of endometriosis (9).

TGF superfamily members promote their biological responses by binding to transmembrane serine/threonine kinases, known as TGF superfamily receptors (10-13). In a study aimed to determine whether leiomyoma, adenomyosis, and endometrial polyps are associated with changes in matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and cytokines in the endometrial cavity, it was noted that the TGF- β 1 levels were significantly higher than those of the control group (14).

Another recently published study that evaluated the topic and ectopic endometria of patients with and without adenomyosis found that adenomyotic lesions had significantly

higher platelet aggregation and increased expression of TGF- β 1 and phosphorylated Smad3 than the control group (4).

Because adenomyosis is very prevalent and has a rather obscure pathophysiology with some evidence pointing to cell invasion abnormality, we propose a study to evaluate TGF- β 1 expression in the ectopic endometrium of women with adenomyosis and to compare it with that in the endometrium of patients without this condition.

Materials and methods

This case-control study used tissue samples embedded in paraffin and fixed in 10% buffered formalin, which were taken from women who underwent a hysterectomy at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre between the years 2011 and 2014. The study cases included the hysterectomy specimens of patients with adenomyosis who were not in menopause at the time of surgery, underwent surgery for a benign disease, and had no history of endometriosis. Hysterectomy specimens from patients undergoing surgery for a benign disease who had no diagnosis of adenomyosis or endometriosis were used as controls. Clinical information (age, weight, skin color, number of pregnancies, cesareans, curettage, smoking, menopause, abortion, surgical indication, abnormal uterine bleeding (AUB), fibroids, operative route, pelvic pain, uterine volume by transvaginal ultrasound (TVUS), and specimen weight) were collected from medical records. The original hematoxylin and eosin slides were reviewed, and a paraffin block was selected for each case and for each control (areas with adenomyosis for the cases and topic endometrium for patients without adenomyosis). Samples with insufficient tissue for immunohistochemical staining were excluded. The final sample contained 28 adenomyosis cases and 21 controls for other diseases (fibroids, prolapse, or endometrial atrophy).

Immunohistochemistry

The specimens (fixed in 10% buffered formalin, processed, and embedded in paraffin) were subjected to histological sectioning using a microtome set to a thickness of 4 μ m. The sections were placed on previously silanized slides. To perform the immunohistochemical technique, the slides were heated in an oven at 80 °C for 30 minutes, deparaffinized in xylene, and rehydrated in ethanol and then in distilled water. Antigen retrieval was performed in a water bath for 20 minutes at 95 °C in pH 6.0 citrate buffer. Endogenous peroxidase activity was blocked with 5% hydrogen peroxide solution

in methanol for 20 minutes. The sections were then incubated overnight in a refrigerator at 2 to 8 °C with the primary antibody (anti-TGF- β , Novusbio, clone: 7F6) at a 1:200 dilution. After incubation, the Santa Cruz Goat anti-mouse IgG-HRP, code SC2005 detection system was added at a 1:200 dilution and incubated for 1 hour and 30 minutes. Reaction visualization was obtained with a Liquid Diaminobenzidine (DAB) Kit (Dako, K3468), according to the manufacturer's recommendations. After visualization, the slides were counterstained in Harris hematoxylin for 10 seconds, and differentiated in 2% ammonia water for 30 seconds. The sections were then dehydrated in absolute alcohol and placed in xylene to mount the slides in Entellan-type resin.

The stained sections were examined under an Olympus BX 51 microscope (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) connected to a Q Color 5 color digital camera (Olympus). The images were obtained with a 200-fold magnification under standardized lighting conditions. Each slide was coded and analyzed using ImageJ Software v.4.0.1 (available at <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The region of interest consisted of an area containing ectopic endometrium in the cases and topic endometrium in the controls, which was subjected to the analysis procedure known as "color deconvolution", written as a "plugin" for the ImageJ software, using the panel with the DAB image. The final DAB intensity was calculated according to the following formula: $f = 255 - i$, where f = final DAB intensity and i = mean DAB intensity obtained from the software. The mean DAB intensity varied from zero (white, expressionless) to 255 (dark brown, the highest expression).

Statistical analysis

IBM SPSS Statistics software version 20.0 was used for all statistical calculations. Student's t test was used to compare the TGF- β 1 expression (mean DAB value after application of the correction formula) and the variables age, smoking, menopause, gestation, cesarean section, uterine curettage, abortion, pelvic pain, abnormal uterine bleeding and fibroids in the endometrium of the two groups. We performed a series of multivariate analyzes, such as logistic regression controlling adenomyosis with the immunohistochemical TGF- β 1 expression. In addition, we controlled the variables gestation, abortion, curettage, cesarean section and smoking with the presence or absence of adenomyosis. Associations were considered significant at $P < 0.05$.

Results

We evaluated 49 uterine specimens of patients who underwent a hysterectomy at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre between the years 2011 and 2014; 28 (57,1%) had adenomyosis, and 21 (42,8%) did not have adenomyosis. The mean age were $46,64 \pm 4,1$ years for adenomyosis and $49,5 \pm 7,03$ years without adenomyosis. The results of the study showed no significant associations between smoking and adenomyosis ($P = 0.75$), abortions and adenomyosis ($P = 0.29$), pregnancies and adenomyosis ($P = 0.85$), curettage and adenomyosis ($P = 0,81$), pelvic pain and adenomyosis ($P = 0.72$) and mioma and adenomyosis ($P = 0,15$). We did find a relationship between adenomyosis and AUB ($P = 0.02$) and adenomyosis and previous cesarean section ($P = 0.02$). (Table 1).

In relation to TGF- β 1 expression, we found no significant association between the ectopic endometrium of women with adenomyosis and the topic endometrium of patients without this condition ($P = 0.86$). (Figures 1 and 2). The linear logistic regression was applied between the groups controlling adenomyosis with the results of immunohistochemistry and we did not find any association between immunohistochemical expression of TGF- β 1 with the presence or absence of adenomyosis ($P = 0,83$), which confirms our previous findings. In addition, we controlled the variables gestation ($P = 0,85$), abortion ($P = 0,29$), curettage ($P = 0,81$), cesarean section ($P = 0,02$) and smoking ($P = 0,75$) with or without adenomyosis. Only cesarean section showed to be a risk factor, which corroborates with our previous univariate analysis.

Table 1: Characteristics of the cases with adenomyosis and the controls without adenomyosis

Characteristic	Without adenomyosis (n = 21)	With adenomyosis (n = 28)	P value
Age (years)	49,5 ±7,03	46,6 ± 4,1	0.79
Smoker n(%)	3 (14.2%)	4 (14.2%)	0.75
Menopause	0 (0%)	14 (51.9%)	0.00
No. of pregnancies	21 (100%)	28 (100%)	0.85
No. of cesarean sections (%)	4 (19.0%)	16 (57.1%)	0.02
No. of curettages (%)	15 (71.4%)	22 (78.5%)	0.81
Abortions	10 (47,6%)	11 (39,2%)	0.29
Pelvic pain	7 (33.3%)	8 (28.5%)	0.72
AUB	13 (61,9%)	27 (96,4%)	0.02
Uterine myomatosis	10 (47,6%)	19 (67.8%)	0.15
Operative route n (%)			0.03
Abdominal	3 (14.2%)	5 (17.8%)	
Vaginal	9 (42.8%)	3 (10.7%)	
Videolaparoscopic	9 (42.8%)	20 (71.4%)	

Difference in values after diaminobenzidine deconvolution in the control groups and adenomyosis using *t* test for independent samples

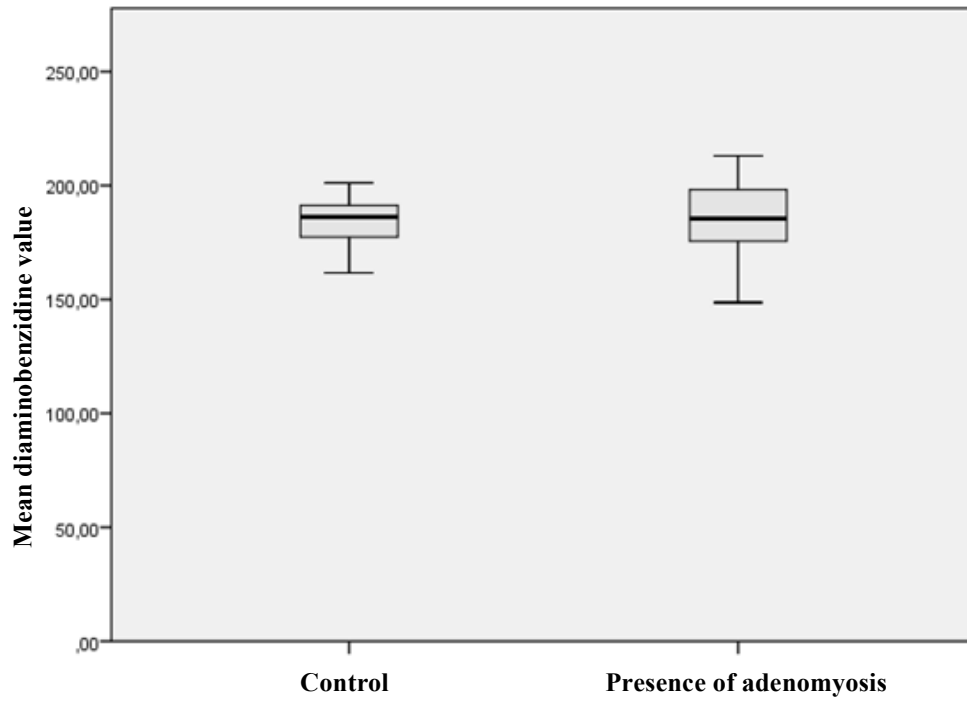


Figure 1. Graph representing the difference in values after deconvolution between the groups with and without adenomyosis

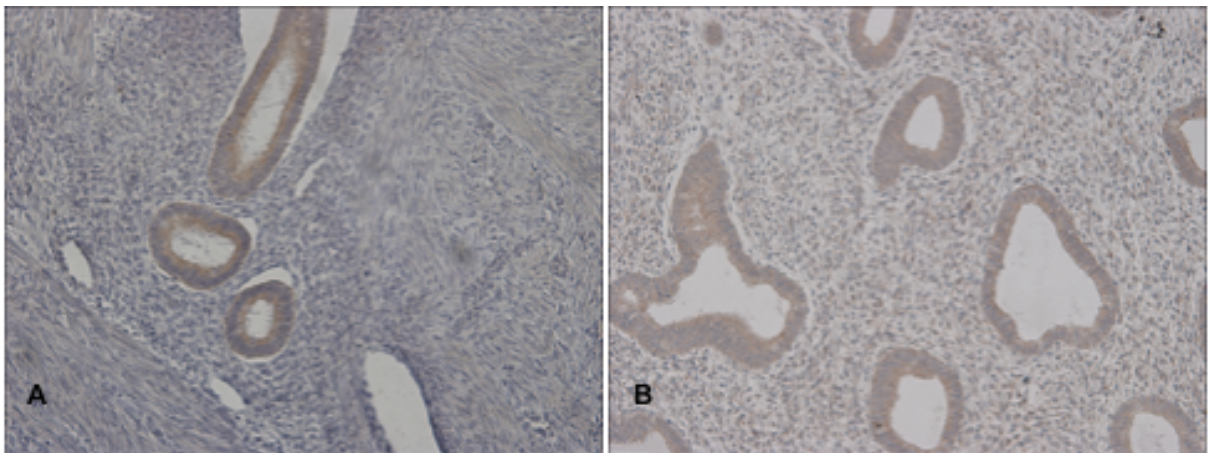


Figure 2. Figure representing the immunostaining of TGF-β1 in adenomyosis (A) and the control endometrium (B).

Discussion

The results presented here show no significant difference in the TGF- β 1 expression between the ectopic and topic endometria. These data are different from those found in the literature. To date, there have been only two published articles evaluating TGF- β 1 expression in the ectopic endometrium of patients with adenomyosis.

In the first, Inagaki et al. evaluated the cytokine expression in uterine flushings from patients with adenomyosis, leiomyoma, and uterine polyps and found significantly higher TGF- β 1 levels than in the control group (14). In another study, in the same manner, Liu et al. evaluated whether endometria with endometriosis, compared with normal endometria, have adenomyosis lesions that exhibit increased platelet aggregation as well as increased expression of TGF- β 1, phosphorylated Smad3, epithelial-mesenchymal transition (TMS) and fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation (FMT) markers and smooth muscle metaplasia (SMM) in conjunction with increased fibrosis. They observed a significant increase in platelet aggregation, TGF- β 1 expression, and phosphorylated Smad3 compared with the control group (4).

In our investigation, we found no relationship between smoking and adenomyosis, these data are in line with another study that found no evidence of an association between adenomyosis and smoking (15). By contrast, two studies reported a higher rate of a smoking history in women with adenomyosis than in controls (16,17). The association between adenomyosis and smoking therefore merits further investigation.

We also did not find a significant relationship between adenomyosis and abortion or adenomyosis and curettage; however, we did find a statistically significant association between the groups with and without adenomyosis regarding the number of cesarean sections.

Evidence regarding a significantly increased risk of uterine adenomyosis in women with previous uterine surgery is inconsistent (18,19). The clinical data support the hypothesis that adenomyosis is a result of endometrial gland invasion into the myometrium. In surgery, interruption of the endomyometrial junction occurs, and consequently, there is an increased risk of developing adenomyosis, according to some studies (20,21). Levгур et al. and Parazzini et al. reported that patients whose pregnancy was terminated via dilation and curettage had higher rates of adenomyosis than did women whose pregnancy was not interrupted (15,21). Furthermore, Parazzini et al. and Taran et al. also observed higher rates of adenomyosis in non-pregnant patients who had undergone dilation and curettage (22,23). Whitted et al. observed an increased prevalence of adenomyosis in patients who had a previous cesarean section (24).

However, other studies have not reported increased rates of cesarean section or other uterine surgery in women with adenomyosis (1,17,25,26). It is therefore not clear whether a history of previous uterine surgery is a risk factor for adenomyosis. Moreover, postulating a relationship between surgical history and the incidence of adenomyosis is risky when not considering the selection of surgical patients.

Although TGF- β 1 did not correlate with adenomyosis, this result shows no indication that TGF- β 1 is or is not associated with the genesis of the disease. Early in its development, TGF- β 1 may be associated with adenomyosis in facilitating cell growth and invasion. However, our study shows that it has no function in the late maintenance of the disease.

A limitation of our study was the advanced age of the adenomyosis cases, which we believe affected our results. This result is explained by the fact that we performed the analysis on hysterectomy specimens, and as mentioned earlier, data in the literature suggest that the presence of sex steroids, both estrogen and progesterone, positively affect TGF- β 1 expression. Another limitation is the characterization of adenomyosis, which may present in

focal (adenomyoma) or diffuse form. In our study, we did not use hysterectomy sections with diagnosed adenomyoma.

Conclusion

We found no increased TGF- β 1 expression in the ectopic endometria of adenomyosis patients. This result disagrees with the literature; however, as discussed previously, there are only two studies published to date, and the mean age of the patients studied was lower in relation to the present investigation. Further studies are necessary to evaluate the expression of this growth factor in adenomyosis and its role in the disease's pathophysiology.

References

1. Bergholt T, Eriksen L, Ferendt N, et al. Prevalence and risk factors of adenomyosis at hysterectomy. *Hum Reprod.* 2001 Nov; 16(11):2418–21.
2. Nilima GS, Gopal KS, Hanisha J. Histopathology findings in patients presenting with menorrhagia: A study of 100 hysterectomy specimen. *J Midlife Health.* 2015 Oct-Dec; 6(4):160-3.
3. Benson RC, Sneed VD. Adenomyosis: a reappraisal of symptomatology. *Am J Obstet Gynecol.* 1958 Nov; 76(5):1044-57.
4. Xishi L, Minhong S, Qiuming Q, Hongqi Z, Sun-Wei G. Corroborating evidence for platelet induced epithelial-mesenchymal transition and fibroblast to myofibroblast transdifferentiation in the development of adenomyosis. *HumReprod.* 2016; 31(4):734-749.
5. Grow D, Filer R. Treatment of adenomyosis with long-term GnRh analogues: a case report. *Obstet Gynecol.* 1991 Sep; 78(3 Pt 2):538–9.
6. Benagiano G, Brosens I. The endometrium in adenomyosis. *Women’s Health.* 2012 May; 8(3):301-12.
7. Carvalho L, Podgaec S, Bellodi-Privato M, Falcone T, Abrao MS. Role of eutopic endometrium in pelvic endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol.* 2011 Jul-Aug; 18(4):419-27.
8. Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction.* 2006 Aug;132(2):217-32.
9. Charles OA O, Lutz K, Gülden H, Frank O, Hans-Rudolf T. Role of TGF-Bs in normal human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod.* 2010; 25(1):101-9.
10. Qinglei L, Julio EA, Mark AE, Ankur KN, Takashi N, Martin MM. Transforming growth factor β receptor type 1 is essential for female reproductive tract integrity and function. *PLoS Genet.* 2011 Oct; 7(10):e1002320.
11. Hua C, Chester WB, Martin MM. Genetic Analysis of the mammalian transforming growth factor-superfamily. *Endocrine Reviews.* 2002;23(6):787-823.
12. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753-91.
13. Izzi L, Attisano L. Regulation of the TGF β signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene.* 2004 Mar; 23(11):2071-8.
14. Inagaki N, Ung L, Otani T, Wilkinson D, Lopata A. Uterine cavity matrixmetalloproteinases and cytokines in patients with leiomyoma, adenomyosis or endometrial polyp. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003 Dec; 111(2):197–203.
15. Parazzini F, Mais V, Cipriani S et al. Determinants of adenomyosis in women who underwent hysterectomy for benign gynecological conditions: results from a prospective multicentric study in Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009 Apr; 143(2):103-6.

16. Taran FA, Wallwiener M, Kabashi D et al. Clinical characteristics indicating adenomyosis at the time of hysterectomy: a retrospective study in 291 patients. *Arch Gynecol Obstet*. 2012 Jun; 285(6):1571-6.
17. Yeniel O, Cirpan T, Ulukus M et al. Adenomyosis: prevalence, risk factors, symptoms and clinical findings. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2007; 34(3):163-7.
18. Vercellini P, Vigano P, Somigliana E, Daguati R, Abbiati A, Fedele L. Adenomyosis: epidemiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006 Aug; 20(4):465-77.
19. Curtis KM, Hillis SD, Marchbanks PA, Peterson HB. Disruption of the endometrial-myometrial border during pregnancy as a risk factor for adenomyosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2002 sept; 187(3):543-4.
20. Panganamamula UR, Harmanli OH, Isik-Akbay EF et al. Is prior uterine surgery a risk factor for adenomyosis? *Obstet Gynecol*. 2004 Nov; 104(5 Pt 1):1034-8.
21. Levgur M, Abadi MA, Tucker A. Adenomyosis: symptoms, histology, and pregnancy terminations. *Obstet Gynecol*. 2000 May; 95(5): 688-91.
22. Parazzini FVP, Panazza S, Chatenoud L et al. Risk factors for adenomyosis. *Hum Reprod*. 1997 Jun; 12(6):1275-9.
23. Taran FA, Weaver AL, Coddington CC et al. Understanding adenomyosis: a case control study. *Fertil Steril*. 2010 Sept; 94(4):1223-8.
24. Whitted R, Verma U, Voigl B et al. Does cesarean delivery increase the prevalence of adenomyosis? A retrospective review. *Obstet Gynecol*. 2000 April; 95(4): S83.
25. Taran FA, Weaver AL, Coddington CC et al. Characteristics indicating adenomyosis coexisting with leiomyomas: a case-control study. *Hum Reprod*. 2010 May; 25(5): 1177-82.
26. Harris WJ, Daniell JF, Baxter JW. Prior cesarean section. A risk factor for adenomyosis? *J Reprod Med*. 1985 Mar; 30(3): 173-5.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos avanços no diagnóstico imagiológico da adenomiose, o seu tratamento continua sendo um grande desafio, refletindo na qualidade de vida e na fertilidade. Estudos sobre a sua origem e manutenção ainda não chegaram a uma conclusão. Em nosso estudo utilizamos imuno-histoquímica e encontramos dados discordantes do encontrado na literatura, porém , até o momento apenas dois estudos foram publicados sobre o tema.

PERSPECTIVAS

Apesar de algumas evidências recentes sugerirem que a adenomiose possa estar ligada a alterações na zona juncional e com anormalidades no endométrio tópico a sua fisiopatologia permanece incerta. Ainda que plausível, o papel da superfamília TGF β na promoção e manutenção da doença não está claro. Além do nosso estudo, apenas dois outros avaliaram a expressão de TGF β 1 no endométrio ectópico de pacientes com adenomiose com resultados conflitantes. Estudos futuros são necessários para estabelecer não só o papel do TGF β 1, mas de outros membros da superfamília TGF na etiopatogenia da doença, o que pode ter grande importância no desenvolvimento de novas formas de rastreio e tratamento da adenomiose.

Bula TGFβ 1

Product Datasheet

**TGF-beta 1 Antibody
NBP2-22114**

Unit Size: 0.1 ml

Store at 4C short term. Aliquot and store at -20C long term. Avoid freeze-thaw cycles.

www.novusbio.com



support@novusbio.com

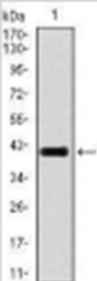
Reviews: 1 Publications: 1

Protocols, Publications, Related Products, Reviews, Research Tools and Images at:
www.novusbio.com/NBP2-22114

Updated 7/17/2014 v.20.1

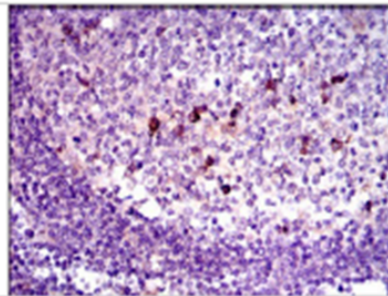
NBP2-22114

TGF-beta 1 Antibody (7F6)

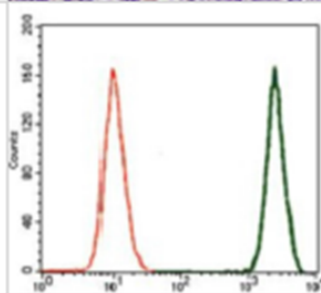
Product Information	
Unit Size	0.1 ml
Concentration	1 mg/ml
Storage	Store at 4C short term. Aliquot and store at -20C long term. Avoid freeze-thaw cycles.
Clonality	Monoclonal
Clone	7F6
Preservative	0.03% Sodium Azide
Isotype	IgG1
Purity	Ammonium sulfate precipitation
Buffer	PBS
Target Molecular Weight	44.3 kDa
Product Description	
Host	Mouse
Gene ID	7040
Gene Symbol	TGFB1
Species	Human
Immunogen	Purified recombinant fragment of human TGF beta 1 (amino acids 62-197) expressed in E. coli. [UniProt# P01137]
Product Application Details	
Applications	Western Blot, ELISA, Flow Cytometry, Immunohistochemistry-Paraffin
Recommended Dilutions	ELISA 1:10000, Flow Cytometry 1:200-1:400, Immunohistochemistry-Paraffin 1:200-1:1000, Western Blot 1:500-1:2000
Application Notes	This TGF beta 1 (7F6) antibody is useful for Western blot, Immunohistochemistry on paraffin-embedded sections, Flow Cytometry and ELISA.
Images	
Western Blot: TGF-beta 1 Antibody (7F6) [NBP2-22114] - Western blot analysis using TGF beta 1 mAb against human TGF beta 1 recombinant protein. (Expected MW is 41 kDa)	



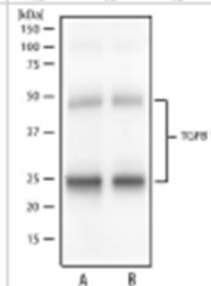
Immunohistochemistry-Paraffin: TGF-beta 1 Antibody (7F6) [NBP2-22114] - Immunohistochemical analysis of paraffin-embedded lymphoid tissue tissues using TGF beta 1 mouse mAb with DAB staining.



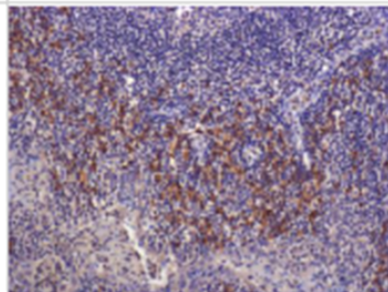
Flow Cytometry: TGF-beta 1 Antibody (7F6) [NBP2-22114] - Flow cytometric analysis of A549 cells using TGF beta 1 mouse mAb (green) and negative control (red).



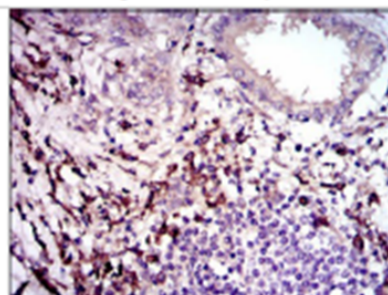
Western Blot: TGF-beta 1 Antibody (7F6) [NBP2-22114] - Western blot analysis of human stomach tissue (A) and human small intestine tissue (B) using TGF beta 1 antibody (NBP2-22114) at 2 ug/ml.



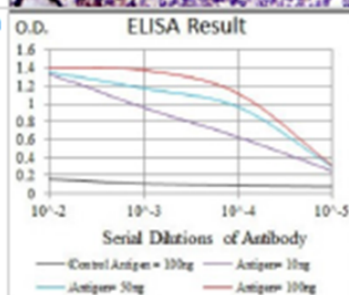
Immunohistochemistry-Paraffin: TGF-beta 1 Antibody (7F6) [NBP2-22114] - Human tonsil. Image from verified customer review.



Immunohistochemistry-Paraffin: TGF-beta 1 Antibody (7F6) [NBP2-22114] - Immunohistochemical analysis of paraffin-embedded lung cancer tissues using TGF beta 1 mouse mAb with DAB staining.



ELISA: TGF-beta 1 Antibody (7F6) [NBP2-22114] - Red: Control Antigen (100ng); Purple: Antigen (10ng); Green: Antigen (50ng); Blue: Antigen (100ng).



Publications

Makboul M, Makboul R, Abdelhafez AH et al. Evaluation of the effect of fractional CO₂ laser on histopathological picture and TGF-b1 expression in hypertrophic scar. J Cosmet Dermatol. 2014 Sep 01 [PMID: 25196683]



**Novus Biologicals USA**

8100 Southpark Way, A-8
Littleton, CO 80120
USA
Phone: 303.730.1950
Toll Free: 1.888.506.6887
Fax: 303.730.1966
novus@novusbio.com

Novus Biologicals Canada

461 North Service Road West, Unit B37
Oakville, ON L6M 2V5
Canada
Phone: 905.827.6400
Toll Free: 855.668.8722
Fax: 905.827.6402
canada@novusbio.com

Novus Biologicals Europe

19 Barton Lane
Abingdon Science Park
Abingdon, OX14 3NB, United Kingdom
Phone: (44) (0) 1235 529449
Free Phone: 0800 37 34 15
Fax: (44) (0) 1235 533420
info@bio-techne.com

General Contact Information

www.novusbio.com
Technical Support: technical@novusbio.com
Orders: orders@novusbio.com
General: novus@novusbio.com

Error: Subreport could not be shown.

Limitations

This product is for research use only and is not approved for use in humans or in clinical diagnosis.
Primary Antibodies are guaranteed for 1 year from date of receipt.

For more information on our guarantee, please visit www.novusbio.com/guarantee.

www.novusbio.com



support@novusbio.com