

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Expressão da MUC1 nas tubas uterinas de mulheres com gravidez tubária

Dissertação de Mestrado

Autor: Ledamir Risti de Brito

Orientador: Ricardo Francalacci Savaris

Porto Alegre

2013

CIP - Catalogação na Publicação

de Brito, Ledamir Risti
Expressão da MUC1 nas tubas uterinas de mulheres
com gravidez tubária / Ledamir Risti de Brito. --
2013.
63 f.

Orientador: Ricardo francalacci Savaris.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Gravidez ectópica, Mucina, MUC1. I. Savaris,
Ricardo francalacci, orient. II. Título.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Expressão da MUC1 nas tubas uterinas de mulheres com gravidez tubária

Dissertação de Mestrado

Autor: Ledamir Risti de Brito

Orientador: Ricardo Francalacci Savaris

Porto Alegre

2013

Ficha Catalográfica

A minha família, especialmente ao meu marido, Jaime, pelo apoio e por tudo que me auxiliou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me auxiliaram de maneira direta ou indireta na realização desse trabalho.

Em especial agradeço a

A Flávia Giusti, funcionária do Centro de Pesquisa Experimental, do setor de Patologia experimental, pelo preparo das lâminas.

A funcionária Zeli Fogaça Pacheco, do setor de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela separação dos blocos de parafina

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo F. Savaris, pela oportunidade desse mestrado e pela orientação.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	7
REVISÃO DA LITERATURA	9
Gravidez Ectópica.....	9
Classificação	10
Epidemiologia.....	10
Fatores de risco	11
Fisiopatologia	12
MUCINA-1.....	14
MUC 1 estrutura - uma proteína com várias funções.....	18
Anticorpos para reconhecer MUC1	19
Regulação da expressão da MUC1	19
MUC1 na trato reprodutivo feminino.....	20
MUC1 na gravidez ectópica	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
JUSTIFICATIVA	28
OBJETIVOS.....	29
Artigo em Inglês	30
Artigo em Português.....	477
Anexo	633

INTRODUÇÃO

As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular que provêm de uma camada protetora na superfície epitelial; elas estão envolvidas na interação célula-célula, sinalização celular e no processo de metastatização (1). Na família das mucinas, encontramos uma classe fortemente glicosilada chamada MUC1 transmembrana a qual é expressa na superfície apical das células epiteliais do trato reprodutivo e do trofotoderma do blastocisto (2). As células que tem alta expressão de MUC1 são refratárias a implatação do blastocisto, enquanto que a remoção da MUC1 permite a implantação (3). Devido ao seu alto grau de glicosilação, essa proteína fornece lubrificação, evita a desidratação e oferece proteção contra a proteólise (4). Sua função na atividade antiadesiva tem sido sugerida como uma barreira de proteção, impedindo o sucesso na implantação do embrião num certo número de espécies animais (5). Quando a implantação embrionária é realizada *in vitro*, existem alguns estudos que sugerem que o blastocisto humano produz os fatores que induzem a remoção local da MUC1 para facilitar a implantação do epitélio em monocamadas do útero (2).

Quando a implantação do blastocisto não ocorre dentro da cavidade uterina, adequadamente, há o desenvolvimento de uma gestação ectópica, onde o local mais frequente é a tuba uterina; a espécie humana é a única que desenvolve espontaneamente a gravidez ectópica (6). Essas duas características, a singularidade dos seres humanos em desenvolver gravidez ectópica nas tubas uterinas e a atividade anti-adesiva da proteína MUC1 na tuba uterina, levou o nosso grupo a questionar se existia uma relação entre a diminuição da expressão da MUC1 no epitélio tubário humano e o desenvolvimento da gravidez ectópica. Em 2008, o nosso grupo verificou que a expressão da MUC1 estava diminuída na tuba uterina de mulheres com gravidez ectópica tubária, quando eram comparadas com tubas normais (7). Al-Azemi e

colaboradores verificaram que essa diminuição de expressão da MUC1 também ocorria, quando outros anticorpos específicos contra MUC1 (BC2 e 214D4) eram utilizados (8).

Nas próximas seções, será revisada a fisiopatologia da gravidez ectópica, a estrutura e a função da MUC1 em diferentes tecidos e alguns dos anticorpos existentes para identificar os diferentes segmentos da MUC1.

REVISÃO DA LITERATURA

Gravidez Ectópica

A gravidez ectópica, ou extra-uterina, é definida como a implantação do blastocisto em qualquer lugar diferente da cavidade uterina. Essa condição constitui cerca de 1 por cento à 2 por cento das gravidezes no Estados Unidos (9). Com o advento do radioimunoensaio, mais sensível e específico para a subunidade β da Gonodotrofina Coriônica Humana (β -hCG), combinado com ultra-sonografia transvaginal de alta resolução, a gravidez ectópica hoje raramente é tão fatal como no passado. No entanto, a gravidez ectópica continua a ser uma importante causa de morbidade e mortalidade nos Estados Unidos (10). No Brasil, os dados não estão registrados adequadamente, mas, a incidência de gravidez ectópica na Emergência do Hospital de Clínicas de Porto Alegre é de 8%, dados obtidos a partir de outro projeto do nosso grupo, que está em andamento (Inexscreen – 11-0113).

Classificação

Quase 95% dos implantes de gravidezes ectópicas aconteceram na trompa de Falópio(11). As gravidezes ectópicas bilaterais são raras, e sua prevalência estimada é de 1 em cada 200 mil gestações (12). Os demais locais de implantação da gravidez ectópica podem ser vistos na Figura 1.

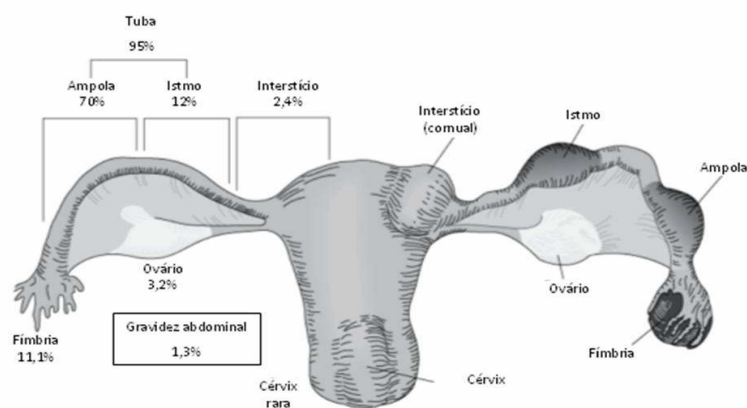


Figura 1. Locais mais frequentes das gestações ectópicas. Obtido de Schorge *et al* (13).

Epidemiologia

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), no ano de 1995, a taxa de gravidez ectópica aumentou nos Estados Unidos quase quatro vezes, de 4,5 por mil gestações em 1970 para 19,1 por mil gestações em 1992. Essa taxa é semelhante às recentes estimativas da Kaiser Permanente do Norte da Califórnia, de 20,7 por mil gestações em 1997-2000 (14). Em 2013, Stulberg *et al* relataram que a taxa de gravidez ectópica em três Estados dos Estados Unidos, onde os pacientes utilizaram

o Medicaid, foi ao redor de 2%. Esses autores concluem que as taxas de gravidez ectópica relatadas no setor privado são subestimadas. {Stulberg, 2013 593 /id}.

Alguns fatores ajudam a explicar o aumento da incidência de gravidez ectópica como: A maior prevalência de doenças sexualmente transmissíveis, especialmente infecções por clamídia (15), as ferramentas de diagnóstico com uma sensibilidade melhorada, fator de infertilidade tubária, incluindo a restauração da permeabilidade tubária ou patologia tubárias documentadas (16), mulheres com gravidez tardia usando tecnologias de reprodução assistida, aumento do uso de dispositivo intra-uterino (DIU) e a laqueadura das tubas. Estes fatores juntos ou separados colaboram para a predisposição da gravidez ectópica com falha do método (17).

Fatores de risco

Considerações dos fatores de risco para a gravidez ectópica podem levar a um diagnóstico mais oportuno. Por exemplo, uma mulher com duas gravidezes ectópicas anteriores tem uma chance 10 vezes maior de ter outra (18). O fumo aumenta o risco de gravidez ectópica de três a quatro vezes em mulheres que fumam mais de um maço de cigarros por dia (19). Além disso, há evidências de estudos com animais, onde a trompa de Falópio é diretamente afetada pelo fumo (10;20).

O uso de tecnologia de reprodução assistida tem uma incidência de 2,6% de gravidez ectópica (21). As taxas de gravidez ectópica são maiores nos casos em que houve transferência de embriões congelados, quando comparado com blastocistos não congelados (22).

Em mulheres submetidas à fertilização *in vitro*, os principais fatores de risco para a gravidez ectópica são os fatores de infertilidade tubária e a hidrossalpinge (23;24)

As mulheres com idade entre 35 a 44 anos tem um risco três vezes maior de gravidez ectópica em comparação com aquelas com idade de 15 a 25 anos (25).

Alguns métodos contraceptivos tendem a aumentar a incidência de gravidez ectópica. Por exemplo, em uma concepção com DIU é mais frequente ocorrer uma gravidez ectópica do que sem o DIU (26). O sistema de liberação intra-uterina com levonorgestrel (SIU-LNG) tem uma taxa cumulativa de gravidez em cinco anos de 0,5 por 100 usuários, das quais metade eram ectópicas (27).

O aborto induzido farmacologicamente, mas não o cirúrgico, quando não realizado por profissional capacitado em local com condições adequadas de higiene, ou fora do ambiente hospitalar, causa lesões maternas. Esse tipo de aborto está associado com um risco aumentado de gravidez ectópica (28;29). A profilaxia antibiótica no momento do aborto diminuiu em 42% o risco de infecção do trato genital superior (30), e talvez possa diminuir a incidência de gravidez ectópica.

Fisiopatologia

Do ponto de vista histopatológico, a falta de uma camada submucosa dentro da tuba de Falópio proporciona um acesso fácil para que o óvulo fertilizado possa penetrar através do epitélio e permite o implante no interior da parede muscular (10). À medida que a proliferação trofoblástica invade a camada muscular subjacente, ocorre uma hemorragia intersticial que pode ser extravasado para a cavidade peritoneal (10).

A localização anatômica de uma gravidez tubária pode prever a extensão dos danos. Em estudo realizado por Senterman *et al*, foram analisadas amostras histológicas de 84 gestações ístmicas e ampulares. Os autores concluíram que metade das gestações ampulares foram intraluminal, e a ístmica foi preservada em 85%. Por outro lado, foram

encontrados gestações ístmicas intra e extraluminal com maior ruptura da parede tubária (31).

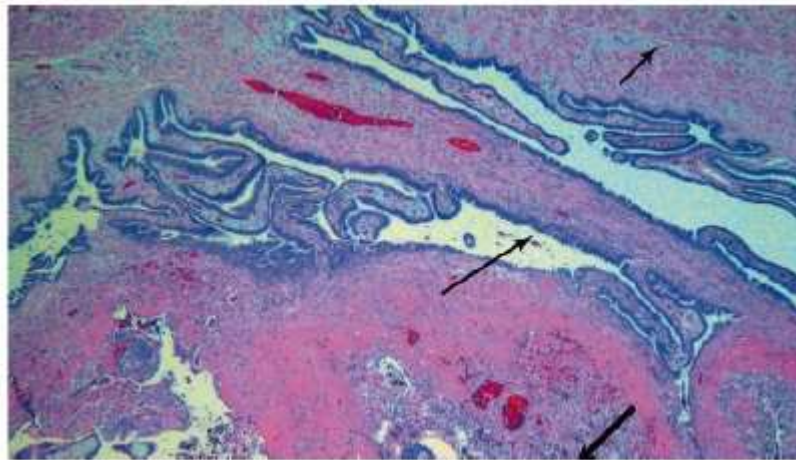


Figura 2. Fotomicrografia da ruptura inicial da tuba uterina. Os vilos coriônicos (seta grossa) e a parede da tuba uterina (seta fina). Obtido de Schorge *et al* (13).

A inflamação aguda da tuba de Falópio implica em danos tubários, o que predispõe para outras gravidezes ectópicas. A salpingite crônica e a salpingite ístmica nodosa também têm papéis importantes no desenvolvimento da gravidez ectópica (32). A inflamação recorrente por clamídia provoca a inflamação intraluminal e a deposição de fibrina com subsequente cicatrização tubária (33). A clamídia pode desencadear uma reação alérgica de hipersensibilidade tardia com cicatrizes, mesmo com os resultados de cultura negativos (34).

Um dos fatores envolvido no transporte tubário de embriões é o receptor canabinóide (CB1), o efeito é mediado pelo sinal endocanabinóide, o qual poderá ter níveis afetados devido à crônica exposição à nicotina, levando a disfunção da tuba uterina (35).

Mulheres que são submetidas a técnicas de reprodução assistida tem uma taxa de gravidez tubária maior, o que tem sido um enigma para os pesquisadores, porque a tuba de Falópio normalmente é ignorada. Revel *et a.* (36) procuraram estabelecer uma relação entre E-caderina, uma molécula de adesão, e os locais de implantação de

gravidez ectópica tubária. Eles demonstraram que a E-Caderina está fortemente expressa apenas em mulheres que se submeteram à fertilização *in vitro*, nos locais de implantação tubária do embrião. Isto sugere um fator biológico, ao invés de um fator mecânico para a causa das gravidezes ectópicas associadas à fertilização *in vitro* (36).

MUCINA-1

As mucinas são proteínas altamente glicosiladas que são expressas por células epiteliais de vários órgãos. Elas são classificadas em duas classes: as mucinas secretadas e as mucinas transmembranas (37). As mucinas formadoras de gel que são secretadas, as quais não tem o domínio transmembrana, incluem a MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8 e MUC19. As mucinas ligadas a membrana, as quais possuem um único domínio e tem uma cauda citoplasmática altamente conservada, são compostas pelo grupo das mucinas MUC3A, MUC4, MUC12, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20 e MUC1 (38). Essas mucinas que estão ligadas à membrana são postuladas como sensores do ambiente externo e podem transmitir sinais para a célula (37). Entre as mucinas, a MUC1 é melhor estudada. Ela tem um papel crucial na regulação de muitas propriedades celulares, incluindo a proliferação, apoptose, adesão e invasão celular (37). Essa proteína transmembrana tem um alto peso molecular (> 400kDa), com uma porção intracitoplasmática de 69 aminoácidos e uma grande porção extracelular composta por um grande número de sequências repetidas de peptídeos (*tandem repeated sequence* - consistindo de 20 aminoácidos), conforme demonstrado na Figura 3.

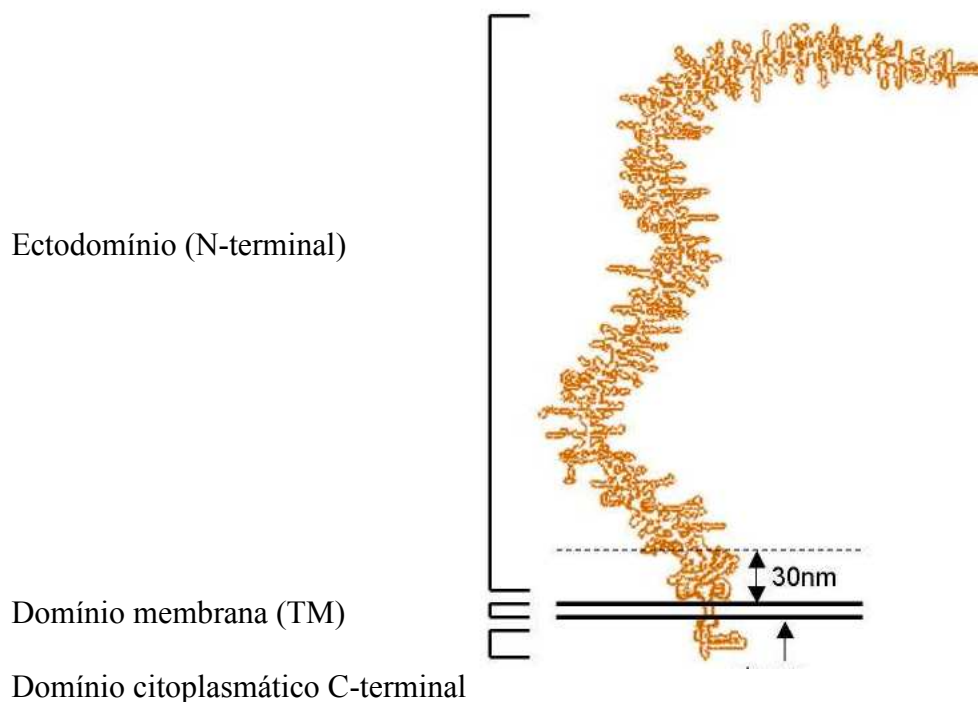


Figura 3. Estrutura da proteína e padrão normal de expressão da MUC1. O diagrama esquemático do tamanho e da estrutura do comprimento total da MUC1 relativa à membrana plasmática. As barras horizontais indicam a distância que a maioria das proteínas de superfície se estendem para dentro do espaço pericelular. Os três maiores domínios da MUC1 estão indicados na esquerda: o N-terminal, o domínio extracelular (ecto); um domínio único da membrana (TM); domínio citoplasmático C-terminal. Obtido de Brayman *et al* (60).

Essa glicoproteína têm um alto conteúdo de carboidratos (mais de 50% do seu peso) e uma porção central rica em treonina/serina que serve como um scaffold para a adição de oligossacarídeos (39).

Como descrito anteriormente, uma característica comum dessa família é a presença de uma região repetitiva (VNTR- número variável de repetições em tandem) formada pelos aminoácidos serina (Ser, AGG) treonina (Thr, TGT), prolina (Pro, GGG), alanina (Ala, CGA) e glicina (Gly, CCG, CCT) (40). O VNTR é também conhecido como região prolina, treonina e serina, devido à alta proporção desses aminoácidos (41) .

Em humanos, o gene da MUC1 codifica uma glicoproteína transmembrana tipo-I que é expressa na superfície apical dos epitélios simples, como a da glândula mamária,

pulmão, rim, estomago, vesícula biliar, pãreas e trato reprodutor feminino (4). O gene da MUC1 está localizado no cromossomo 1 na região 1q21 e é formado por 6 íntrons e 7 éxons que, dependendo do número variável de repetições em tandem localizado no segundo éxon, pode variar de 4 a 7 kb (42;43). Dentre os sítios de ligação para regulação de transcrição está o receptor de estrogênio NF-KB e o receptor de progesterona TNF- α (44).

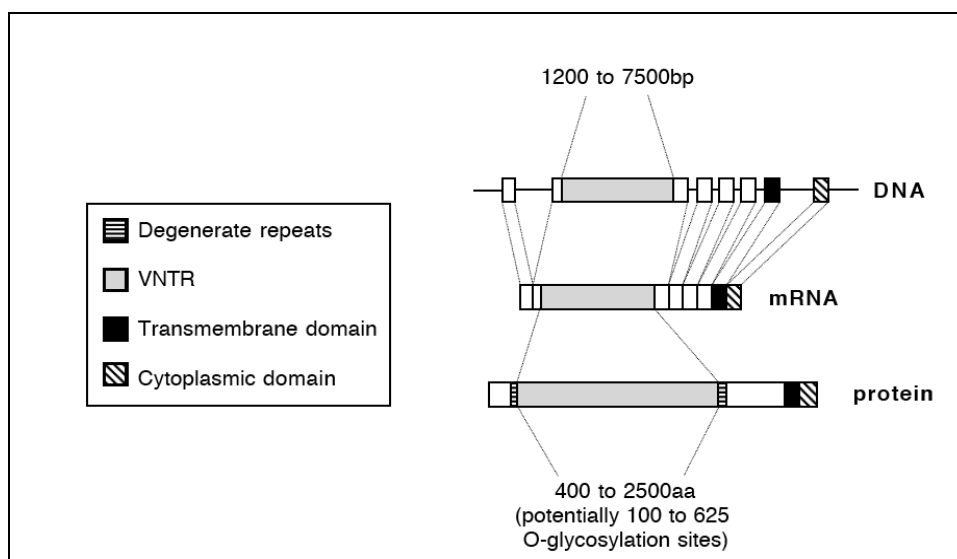


Figura 4. Representação esquemática da MUC1. Obtida de Horne *et al* (6)

A proteína possui três isoformas que são geradas pelo *splicing* alternativo da transcrição primária da MUC1: MUC1, MUC/Y e MUC1/SEC (45). A MUC1 é uma proteína com 200 a 500 kDa, a qual contém o domínio VNTR, flanqueado por regiões pequenas contendo peptídeos repetidos, o domínio transmembrana e o citoplasmático (conforme Figura 3). A isoforma MUC1/Y não possui o domínio transmembrana e a MUC1-Y não possui a região repetitiva VNTR, a região transmembrana e o domínio citoplasmático. A MUC1/Y serve como apoio de ligação para a MUC1/SEC secretada, a qual contém arranjos de repetição em tandem, mas não tem o domínio transmembrana (45;46). Após a tradução, o núcleo da proteína MUC1 é modificado por uma extensa

glicosilação, particularmente dentro do domínio VNTR, o qual tem 5 sítios potenciais de *O*-glicosilação por repetição (três treoninas, e duas serinas) (47), enquanto que os aminoácidos de prolina formam uma extensa molécula, fazendo-a chegar bem acima da superfície da célula (40;43). Logo após a tradução, a MUC1 sofre modificações proteolíticas, com a clivagem em 58 aminoácidos acima do domínio transmembrana, onde, as duas partes da molécula permanecem unidas por forças não covalentes (43).

A glicoproteína transmembrana é formada por uma cauda citoplasmática fosforilada com 72 aminoácidos com sítios sinalizadores, com uma região transmembrana hidrofóbica, por um domínio SEA (sea urchin sperm protein, Enterokinase and Agrin), todos altamente conservados (48).

Como a presença de regiões de prolina, treonina e serina (PTS) está associada à sequência polipeptídica e não a características bioquímicas da molécula, sua presença tornou-se um dos principais critérios utilizados pela Human Genome Organization / gene Nomenclature Committee para definir uma mucina (43). Com isso, foi possível isolar as modificações pós-tradução, traçar uma paralelo entre a glicoproteína e os genes e dessa forma definir criteriosamente uma mucina. Apesar disso, as características das mucinas de locos diferentes não são inteiramente compartilhadas, sugerindo que nesses casos deva ter havido uma evolução convergente das regiões PTS (41), conforme apresentado na figura 5 .

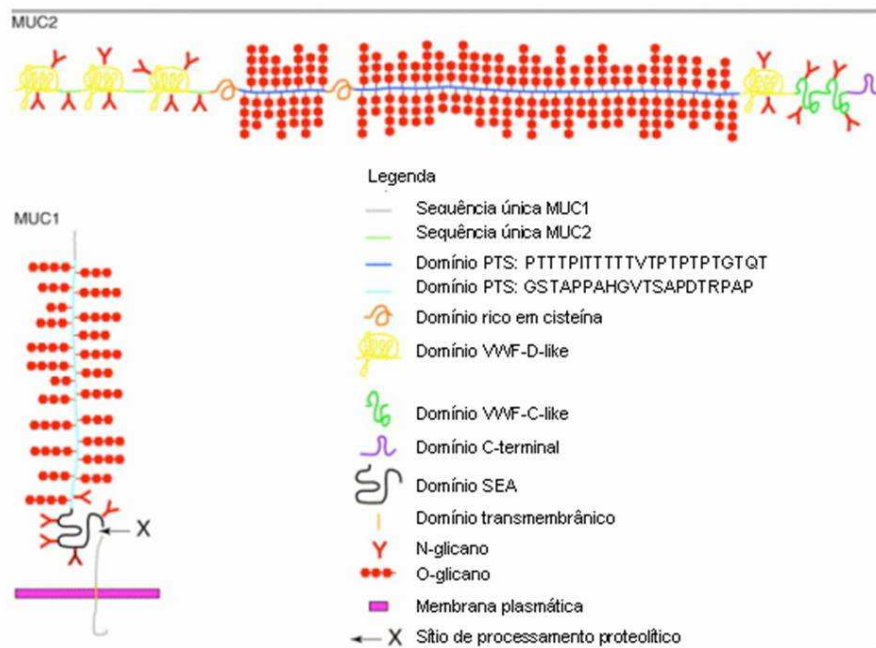


Figura 5. Como reconhecer uma mucina? As duas mucinas bem caracterizadas, MUC1 e MUC2, apresentam estruturas superficiais semelhantes das glicoproteínas, e também demonstram que essas moléculas, de fato, são muito diferentes (indicado pelo sistema de cores na figura). A MUC1 se torna o epítomo de mucina ligada à membrana; A MUC2 representa a mucina secretada que forma as camadas de muco. Obtido de Dekker et al. (41)

MUC 1 estrutura - uma proteína com várias funções

Inicialmente, as mucinas foram associadas à proteção e à lubrificação das superfícies epiteliais, depois pesquisadores começaram a realizar diversos estudos descrevendo as funções da MUC1 na renovação, diferenciação e integridade epitelial, bem como na , atividade ante-adesiva no desenvolvimento fetal e na carcinogênese (49).

MUC1 é altamente expressa por diferentes célula tumorais e é frequentemente encontrada em uma distribuição não-polarizada ou mesmo em locais intracelulares, o que se associa a um mau prognóstico em pacientes com estes tumores (50). As funções variam de interações com os componentes da membrana do plasma das ações nas mitocôndrias, citoplasma e núcleo. Outros trabalhos também tem indicado que o domínio citoplasmático (CD) da MUC1 ativa a transcrição de genes alvos, direta ou indiretamente (51;52).

A atividade anti-adesiva é demonstrada através da expressão da MUC1 em todos os níveis da tuba uterina, por todo o ciclo menstrual (6;53). Essa expressão é maior na tuba uterina do que no epitélio da cavidade endometrial, sugerindo um gradiente para impedir a implantação de uma gestação ectópica na tuba.

Anticorpos para reconhecer MUC1

Em 1998, Petrakou et al. analisaram 56 anticorpos contra MUC1 e publicaram os seus resultados (54).

O anticorpo EPR1023 detecta todo o comprimento da MUC1 e a subunidade carbóxi-terminal de 20 kDa (56). A glicofoma reativa HMFG1 é uma precursora da glicofoma reativa 214D4 em células tronco embrionárias humanas e no epitélio uterino normal(57).

Regulação da expressão da MUC1

A expressão específica de cada tecido e a regulação da MUC1 foi demonstrada em camundongo transgênico (58). Na análise da região promotora proximal 1,6 kb, a supressão *in vitro* demonstrou que os elementos na região de 400 pb a 600 pb a montante do local de iniciação da transcrição são necessários para a atividade máxima do promotor, e os elementos entre -60 pb e -150 pb são necessários para especificidade tecidual. Vários elementos reguladores da sequência da MUC1 flanqueadora 5' foram caracterizados funcionalmente conforme Figura 6.

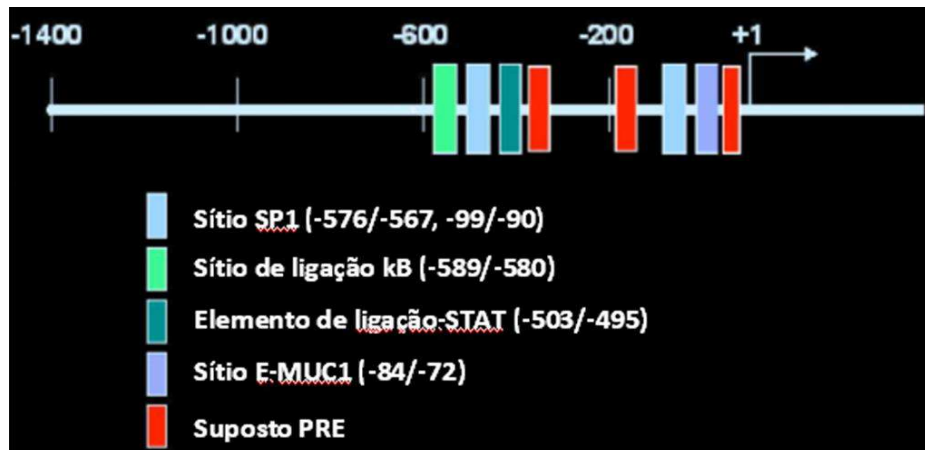


Figura 6. Promoter proximal da MUC1. O promoter proximal humano da MUC1 de 1.4 kb é suficiente para iniciar a expressão de acordo com o tipo de tecido no modelo de camundongo transgênico. Os elementos *Cis* demonstraram ser importantes para a regulação da MUC1, incluindo os sítios Sp1, o κB, o elemento de ligação STAT e E-MUC1 (E box). A localização de vários elementos de resposta potenciais para a progesterona (PRE) também está demonstrada. Obtido de Brayman *et al* (60).

O interferon- γ (IFN)- γ aumenta a expressão da MUC1 em células epiteliais mamárias humanas através do transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT)-1 α (59).

A expressão da MUC1 é controlada por hormônios esteróides na mama e no útero.

Vários elementos de resposta ao progesterona e ao estrogênio tem sido identificados na sequência promotora da MUC1 humana. A expressão da MUC1 no endométrio humano é maior na fase secretora (4).

MUC1 no trato reprodutivo feminino

MUC1 no trato genital feminino: O trato reprodutivo feminino é revestido por uma mucosa que ajuda a inibir a ação de agentes tóxicos e infecciosos, propiciando ambiente adequado para a implantação do embrião (60). O período no qual o útero permite a implantação do embrião é transitório e controlado pela ação de hormônios ovarianos (60). Atuando como uma das principais glicoproteínas da superfície do lúmen do endométrio, a MUC1 é geralmente comparada com uma barreira anti-adesiva entre as células da trofotoderma do embrião e as células luminiais do epitélio uterino (42). Alguns estudos de expressão gênica da MUC1 endometrial nas fases do ciclo

uterino e estágios iniciais da gestação em vários mamíferos demonstraram que a expressão uterina difere entre as espécies. Estudos experimentais realizados por Aplin (5) revelaram a ausência ou redução da expressão de MUC1 durante a fase de implantação. Entretanto em humanos e coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), relatou-se em um estudo em 2001, aumentos nos níveis da MUC1 por toda a superfície luminal uterina (5). Ainda foi observado em humanos e em coelhos que a taxa regulatória da progesterona foi elevada, sendo, associada com a expressão positiva da MUC1, ao passo que nos outros mamíferos estudados tal condição foi associada à ausência ou menores índices de expressão da glicoproteína (61-63). Esta hipótese da taxa regulatória da progesterona em relação a expressão positiva de MUC1 é coerente com a elevada taxa de embriões anormais e com a expressão reduzida da MUC1 descrita em estudos realizados com mulheres com abortos espontâneos recorrentes (2;5).

MUC1 na gravidez ectópica

Os humanos, diferentes dos outros animais, são passíveis de ter uma gravidez ectópica tubária (6). Portanto, a não expressão da MUC1 pode ser um mecanismo que explicaria a presença da gravidez ectópica. Estudos anteriores de Savaris *et al* (7) e de Al-Alzemi *et al* (8) demonstraram que a glicosilação é diferente entre tubas de Falópio normais e tubas com gravidez ectópica. Ambos autores sugeriram que a redução na expressão da MUC1 no epitélio tubário poderia estar relacionada com a etiologia da gravidez tubária. Contudo, o primeiro trabalho, realizado por Savaris *et al* (7), conta com o viés de que apenas um anticorpo (VPM-654) foi utilizado. Da mesma forma, o segundo trabalho, realizado por Al-Alzemi *et al* (8) obteve alguns resultados com viés.

Outro estudo de Refaat *et al* (65), têm mostrado que elevados níveis de MUC1 poderão inibir a adesão célula-célula por alterações espaciais na configuração da

proteína porque a porção extracelular estende-se para além do raio de aderência de promoção de ligandos (65).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parry S, Silverman HS, McDermott K, Willis A, Hollingsworth MA, Harris A. Identification of MUC1 proteolytic cleavage sites in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 May 11;283(3):715-20.
2. Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor JE, Martin JC, Remohi J, et al. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod* 2001 Feb;64(2):590-601.
3. DeSouza MM, Mani SK, Julian J, Carson DD. Reduction of mucin-1 expression during the receptive phase in the rat uterus. *Biol Reprod* 1998 Jun;58(6):1503-7.
4. Brayman M, Thathiah A, Carson DD. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol* 2004 Jan 7;2:4.
5. Aplin JD, Meseguer M, Simon C, Ortiz ME, Croxatto H, Jones CJ. MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochem Soc Trans* 2001 May;29(Pt 2):153-6.
6. Horne AW, White JO, Lalani e. Adhesion molecules and the normal endometrium. *BJOG* 2002 Jun;109(6):610-7.
7. Savaris RF, da Silva LC, Moraes GS, Edelweiss MI. Expression of MUC1 in tubal pregnancy. *Fertil Steril* 2008 Apr;89(4):1015-7.
8. Al-Azemi M, Refaat B, Aplin J, Ledger W. The expression of MUC1 in human Fallopian tube during the menstrual cycle and in ectopic pregnancy. *Hum Reprod* 2009 Oct;24(10):2582-7.
9. Zane SB, Kieke BA, Jr., Kendrick JS, Bruce C. Surveillance in a time of changing health care practices: estimating ectopic pregnancy incidence in the United States. *Matern Child Health J* 2002 Dec;6(4):227-36.
10. Shaw JL, Dey SK, Critchley HO, Horne AW. Current knowledge of the aetiology of human tubal ectopic pregnancy. *Hum Reprod Update* 2010 Jul;16(4):432-44.
11. Hoffman B.L. SJOSJIHLMBKDCFGCLE. *Williams Gynecology*. 2e. ed. 2012.
12. al-Awwad MM, al DN, Eseet JS. Spontaneous unruptured bilateral ectopic pregnancy: conservative tubal surgery. *Obstet Gynecol Surv* 1999 Sep;54(9):543-4.
13. Schorge JO, Schaffer JL, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Ectopic Pregnancy. In: Schorge JO, Schaffer JL, Halvorson

LM, Bradshaw KD, Cunningham FG, eds. Williams Gynecology. 2 ed. New York: McGraw Hill; 2012. p. 198-218.

14. Van Den Eeden SK, Shan J, Bruce C, Glasser M. Ectopic pregnancy rate and treatment utilization in a large managed care organization. *Obstet Gynecol* 2005 May;105(5 Pt 1):1052-7.
15. Rajkhowa M, Glass MR, Rutherford AJ, Balen AH, Sharma V, Cuckle HS. Trends in the incidence of ectopic pregnancy in England and Wales from 1966 to 1996. *BJOG* 2000 Mar;107(3):369-74.
16. Ankum WM, Mol BW, van d, V, Bossuyt PM. Risk factors for ectopic pregnancy: a meta-analysis. *Fertil Steril* 1996 Jun;65(6):1093-9.
17. Mol BW, Ankum WM, Bossuyt PM, van d, V. Contraception and the risk of ectopic pregnancy: a meta-analysis. *Contraception* 1995 Dec;52(6):337-41.
18. Skjeldestad FE, Hadgu A, Eriksson N. Epidemiology of repeat ectopic pregnancy: a population-based prospective cohort study. *Obstet Gynecol* 1998 Jan;91(1):129-35.
19. Saraiya M, Berg CJ, Kendrick JS, Strauss LT, Atrash HK, Ahn YW. Cigarette smoking as a risk factor for ectopic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998 Mar;178(3):493-8.
20. Talbot P, Riveles K. Smoking and reproduction: the oviduct as a target of cigarette smoke. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:52.
21. Clayton HB, Schieve LA, Peterson HB, Jamieson DJ, Reynolds MA, Wright VC. Ectopic pregnancy risk with assisted reproductive technology procedures. *Obstet Gynecol* 2006 Mar;107(3):595-604.
22. Jun SH, Milki AA. Ectopic pregnancy rates with frozen compared with fresh blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2007 Sep;88(3):629-31.
23. Strandell A, Thorburn J, Hamberger L. Risk factors for ectopic pregnancy in assisted reproduction. *Fertil Steril* 1999 Feb;71(2):282-6.
24. Van Voorhis BJ. Outcomes from assisted reproductive technology. *Obstet Gynecol* 2006 Jan;107(1):183-200.
25. Goldner TE, Lawson HW, Xia Z, Atrash HK. Surveillance for ectopic pregnancy--United States, 1970-1989. *MMWR CDC Surveill Summ* 1993 Dec 17;42(6):73-85.
26. Iavazzo C, Salakos N, Vitoratos N, Bakalianou K, Deligeoroglou E, Dalainas H, et al. Intrauterine devices and extrauterine pregnancy. A literature review. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2008;35(2):103-6.
27. Backman T, Rauramo I, Huhtala S, Koskenvuo M. Pregnancy during the use of levonorgestrel intrauterine system. *Am J Obstet Gynecol* 2004 Jan;190(1):50-4.

28. Bouyer J, Coste J, Shojaei T, Pouly JL, Fernandez H, Gerbaud L, et al. Risk factors for ectopic pregnancy: a comprehensive analysis based on a large case-control, population-based study in France. *Am J Epidemiol* 2003 Feb 1;157(3):185-94.
29. Tharaux-Deneux C, Bouyer J, Job-Spira N, Coste J, Spira A. Risk of ectopic pregnancy and previous induced abortion. *Am J Public Health* 1998 Mar;88(3):401-5.
30. Sawaya GF, Grady D, Kerlikowske K, Grimes DA. Antibiotics at the time of induced abortion: the case for universal prophylaxis based on a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1996 May;87(5 Pt 2):884-90.
31. Senterman M, Jibodh R, Tulandi T. Histopathologic study of ampullary and isthmic tubal ectopic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1988 Oct;159(4):939-41.
32. Kutluay L, Vicdan K, Turan C, Batioglu S, Oguz S, Gokmen O. Tubal histopathology in ectopic pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1994 Nov;57(2):91-4.
33. Lepine LA, Hillis SD, Marchbanks PA, Joesoef MR, Peterson HB, Westrom L. Severity of pelvic inflammatory disease as a predictor of the probability of live birth. *Am J Obstet Gynecol* 1998 May;178(5):977-81.
34. Toth M, Patton DL, Campbell LA, Carretta EI, Mouradian J, Toth A, et al. Detection of chlamydial antigenic material in ovarian, prostatic, ectopic pregnancy and semen samples of culture-negative subjects. *Am J Reprod Immunol* 2000 Apr;43(4):218-22.
35. Horne AW, Phillips JA, III, Kane N, Lourenco PC, McDonald SE, Williams AR, et al. CB1 expression is attenuated in Fallopian tube and decidua of women with ectopic pregnancy. *PLoS One* 2008;3(12):e3969.
36. Revel A, Ophir I, Koler M, Achache H, Prus D. Changing etiology of tubal pregnancy following IVF. *Hum Reprod* 2008 Jun;23(6):1372-6.
37. Singh PK, Hollingsworth MA. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends Cell Biol* 2006 Sep;16(9):467-76.
38. von Mensdorff-Pouilly S, Snijdwint FG, Verstraeten AA, Verheijen RH, Kenemans P. Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein. *Int J Biol Markers* 2000 Oct;15(4):343-56.
39. Hinoda Y, Imai K. [Molecular biological analyses of mucin core proteins and their clinical application]. *Gan To Kagaku Ryoho* 1994 Feb;21(2):150-6.
40. Patton S, Gendler SJ, Spicer AP. The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues. *Biochim Biophys Acta* 1995 Dec 20;1241(3):407-23.
41. Dekker J, Rossen JW, Buller HA, Einerhand AW. The MUC family: an obituary. *Trends Biochem Sci* 2002 Mar;27(3):126-31.

42. Hey NA, Meseguer M, Simon C, Smorodinsky NI, Wreschner DH, Ortiz ME, et al. Transmembrane and truncated (SEC) isoforms of MUC1 in the human endometrium and Fallopian tube. *Reprod Biol Endocrinol* 2003 Jan 30;1:2.
43. de Souza FR, Dentillo DB, Meola J, Biase FH, Andrea MV, Vozzi PA, et al. The polymorphism in MUC1 gene in Nelore cattle. *J Anim Breed Genet* 2007 Feb;124(1):42-6.
44. Gendler SJ. MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001 Jul;6(3):339-53.
45. Baruch A, Hartmann M, Yoeli M, Adereth Y, Greenstein S, Stadler Y, et al. The breast cancer-associated MUC1 gene generates both a receptor and its cognate binding protein. *Cancer Res* 1999 Apr 1;59(7):1552-61.
46. Zrihan-Licht S, Vos HL, Baruch A, Elroy-Stein O, Sagiv D, Keydar I, et al. Characterization and molecular cloning of a novel MUC1 protein, devoid of tandem repeats, expressed in human breast cancer tissue. *Eur J Biochem* 1994 Sep 1;224(2):787-95.
47. Ligtenberg MJ, Vos HL, Gennissen AM, Hilkens J. Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J Biol Chem* 1990 Apr 5;265(10):5573-8.
48. Duraisamy S, Ramasamy S, Kharbanda S, Kufe D. Distinct evolution of the human carcinoma-associated transmembrane mucins, MUC1, MUC4 AND MUC16. *Gene* 2006 May 24;373:28-34.
49. Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci* 2001 Oct 1;6:D1192-D1206.
50. Carson DD. The cytoplasmic tail of MUC1: a very busy place. *Sci Signal* 2008;1(27):e35.
51. Huang L, Ren J, Chen D, Li Y, Kharbanda S, Kufe D. MUC1 cytoplasmic domain coactivates Wnt target gene transcription and confers transformation. *Cancer Biol Ther* 2003 Nov;2(6):702-6.
52. Yin L, Huang L, Kufe D. MUC1 oncoprotein activates the FOXO3a transcription factor in a survival response to oxidative stress. *J Biol Chem* 2004 Oct 29;279(44):45721-7.
53. Burdick MD, Harris A, Reid CJ, Iwamura T, Hollingsworth MA. Oligosaccharides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines. *J Biol Chem* 1997 Sep 26;272(39):24198-202.
54. Petrakou E, Murray A, Price MR. Epitope mapping of anti-MUC1 mucin protein core monoclonal antibodies. *Tumour Biol* 1998;19 Suppl 1:21-9.
55. Yonezawa S, Sato E. Expression of mucin antigens in human cancers and its relationship with malignancy potential. *Pathol Int* 1997 Dec;47(12):813-30.

56. Data sheet - Anti-MUC1 antibody [EPR1023] Epitomics Catalog No. 2900-1. abcam company 2012 Available from: URL: <http://www.abcam.com/muc1-antibody-epr1023-ab109185.html>, acessado em 18 abril, 2013.
57. Wang P, Julian JA, Carson DD. The MUC1 HMFG1 glycoform is a precursor to the 214D4 glycoform in the human uterine epithelial cell line, HES. *Biol Reprod* 2008 Feb;78(2):290-8.
58. Peat N, Gendler SJ, Lalani N, Duhig T, Taylor-Papadimitriou J. Tissue-specific expression of a human polymorphic epithelial mucin (MUC1) in transgenic mice. *Cancer Res* 1992 Apr 1;52(7):1954-60.
59. Lagow EL, Carson DD. Synergistic stimulation of MUC1 expression in normal breast epithelia and breast cancer cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Cell Biochem* 2002;86(4):759-72.
60. Brayman MJ, Dharmaraj N, Lagow E, Carson DD. MUC1 expression is repressed by protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription-y. *Mol Endocrinol* 2007 Nov;21(11):2725-37.
61. Hoffman LH, Olson GE, Carson DD, Chilton BS. Progesterone and implanting blastocysts regulate Muc1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology* 1998 Jan;139(1):266-71.
62. Mather IH, Jack LJ, Madara PJ, Johnson VG. The distribution of MUC1, an apical membrane glycoprotein, in mammary epithelial cells at the resolution of the electron microscope: implications for the mechanism of milk secretion. *Cell Tissue Res* 2001 Apr;304(1):91-101.
63. Hey NA, Graham RA, Seif MW, Aplin JD. The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 Feb;78(2):337-42.
64. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001 Aug;23(4):291-9.
65. Refaat B, Simpson H, Britton E, Biswas J, Wells M, Aplin JD et al. Why does the fallopian tube fail in ectopic pregnancy? The role of activins, inducible nitric oxide synthase, and MUC1 in ectopic implantation. *Fertil Steril* 2012;97:1115-23

JUSTIFICATIVA

A determinação da expressão da MUC1 poderá auxiliar a compreender os mecanismos envolvidos na etiologia da gravidez ectópica. A utilização dos diferentes anticorpos monoclonais ampliará a especificidade dos resultados. Além disso, a MUC1 pode ser dosada no soro humano podendo ser, futuramente, um marcador para essa doença.

OBJETIVOS

Determinar a expressão da mucina MUC1, utilizando quatro tipos de anticorpos monoclonais diferentes (HMFG1, 214D4, VPM654, EPR1023), no epitélio tubário de mulheres com gravidez ectópica.

Identificar a localização da MUC1 na porção apical e intracelular com o anticorpo 214D4.

Artigo em Inglês

Structured Abstract:

Objective: To compare the expression of 4 antibodies against MUC1 in Fallopian tubes with or without ectopic pregnancy.

Design: Case-control study.

Setting: Tertiary teaching hospital

Patients: Patients with ectopic pregnancy (n=10) who underwent ectopic pregnancy and patients with normal Fallopian tubes (n=16) who were submitted to total hysterectomy due to benign conditions.

Interventions: Immunohistochemical analysis of MUC1 was performed on tissue sections of ectopic pregnancy and normal tubes from paraffin embedded blocks, using 214D4, EPR1023, HMFG1 and VPM654 antibodies against MUC1.

Main Outcome Measure: Intensity of the staining with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) using ImageJ software.

Results: The mean intensity of MUC1 (mean±SD, or median[interquartile]) in mucosal of Fallopian tubes with ectopic pregnancy was increased for EPR1023 (23.73±13.63 vs. 8.5±5.1 – P= 0.006), and reduced for VPM654 (13.7[13 to 16.2] vs. 22.5[19.5 to 29.7] – P=0.005) compared to normal tubes.

Conclusion: MUC1 expression is altered in tubes with ectopic pregnancy compared to normal tubes.

Key Words: Ectopic Pregnancy; MUC1; EPR1023; VPM654; HMFG1

Introduction

MUC1 is a protein normally expressed on the apical surface of epithelial cells of mammary and salivary glands, esophagus, stomach, pancreas, bile ducts, respiratory and urogenital tract (1). In Fallopian tubes only MUC1 is expressed (2). The functions of MUC1 include lubrication, protection against pathogens and it has an anti-adhesive property (3, 4). Furthermore, the expression of MUC1 is constant in all levels of the Fallopian tube and throughout the menstrual cycle (5). The immunoreactivity of MUC1 is higher in the oviduct than in the epithelium of the endometrial cavity, suggesting a gradient to prevent the implantation of an ectopic pregnancy in the oviduct. The mechanisms related to ectopic pregnancy in humans still remains to be elucidated. It has been proposed that a variety of sex steroid hormones, interleukins and glycoproteins are related to abnormal function of the Fallopian tubes that eventually leads to ectopic pregnancy (6, 7). Among these glycoproteins, MUC1 was first investigated by our group (8) and followed by others (9). In both studies, the investigators found that MUC1 expression is reduced, suggesting a reduced anti-adhesiveness activity in tubal epithelium. Al-Azemi *et al.* used 2 antibodies against the external domain of MUC1 (BC2 and 214D4) and measured the protein expression in a semi-quantitative scale that is prone to subjectivity. In addition, these authors reported that the expression of the antibody 214D4 against MUC1 is only apical during the follicular phase of the menstrual cycle, and during the luteal phase, its localization is apical and intracellular, but details of these findings are scant (9). The cytoplasmic C-terminal domain of MUC1 is a highly conserved region of MUC1 and it is involved in cell signaling through

various phosphorylation events (10). Due to variability in expression of these glycoforms, it is important to test markers within the cytoplasmic and external domain in a more sophisticated manner to confirm the results presented in the literature. A panel of different monoclonal antibodies against MUC1, such as VPM654, EPR1023, HMFG, and 214D4, would properly identify these differences, because they identify different domains of MUC1 (11). Therefore, the primary aim of this study was to compare the expression of MUC1 on the tubal epithelium of women with or without ectopic pregnancy in order to better understand the mechanisms involved in this condition. The secondary objective was to better identify the location of MUC1 in the apical and intracellular portion of the cells in 214D4 antibody.

Material and methods

For this case-control study, formalin fixed paraffin embedded tissues were obtained from the archives of the *Pathology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA), from 2010 and 2011. An experienced pathologist reviewed the slides and confirmed the diagnosis of ectopic pregnancy and normal tubes. Normal tubes were obtained from total hysterectomy specimens for benign conditions (leiomyoma and dysfunctional uterine bleeding). Cases with cancer and acute salpingitis were excluded. Ectopic pregnancies were obtained from surgical specimens. The pathology report from the surgical specimen related to the endometrium, i.e., proliferative, luteal or atrophic and data from clinical records determined the phase of the menstrual cycle.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry staining was performed using the primary antibody against MUC1 according to Table 1. The negative external controls were obtained by carrying

out immunostaining without the primary antibody. Known MUC1 positive specimens (breast tissue) were used as positive external controls. Stained sections were analyzed with an Olympus BX51 microscope (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) connected to a digital color camera/Q-Color 5 (Olympus). The slide was evaluated by using multiple digital pictures, one microscopic field=one picture. Images were obtained with a 4x or 10x objective UPLanFI (resolution: 0.45 μ m), at a size of 2560x1920 pixels [resolution: 1mm = 590 pixels (40x), 1512 pixels (100x)], under standard lighting conditions.

The intracellular expression of antibody 214D4 was defined as any presence of immunostaining inside the epithelial cells of the oviduct, while the apical expression was considered when staining was solely found in the apical portion of epithelial cells. The whole specimen in slide was considered in the analysis.

ImageJ

Each slide was coded and blindly analyzed with the image analysis software ImageJ v.4.0.1 (available at <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The region of interest (ROI) consisted in a full cross section of the Fallopian tube including only the epithelial mucosal, i.e., the lumen. After selecting the ROI, the image was submitted to the analytical procedure named “color deconvolution” written as a “plugin” for ImageJ software, using a built-in vector for Hematoxylin and DAB (HDAB) staining (64). This plugin separates the image into 3 different panels through the process of “color deconvolution”: panel a) hematoxylin only, panel b) with diaminobenzidine (DAB), and panel c) background. The panel with hematoxylin only picture was selected and converted into a binary picture. From this binary picture, a “mask” was created to identify the ROI, and this file was saved in the ROI manager, inside the software. After that, the panel with DAB only was overlaying with the “mask” saved in the ROI manager. The DAB staining intensity

and the total area were measured by the software, yielding the mean intensity of the DAB immunostaining from the ROI. When multiple pictures were taken from the same specimen, the average intensity of DAB was calculated. The final DAB intensity was calculated according to the formula: $f = 255 - i$, where f = final DAB intensity, i = mean DAB intensity obtained from the software. The mean DAB intensity varied from 0 (white, no expression) to 255 (dark brown, highest expression).

Ethics, sample size calculation and statistical analysis

The ethics committee of HCPA, *Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, approved the study (Number 10-0448).

Because only paraffin blocks were used from the pathology archives, the IRB waived the written informed consent, but the authors of this study had to sign a statement to preserve the privacy of the patients, and all data were used exclusively for this present study. Sample size was calculated according to the formula described in the literature (13), using the following parameters: an alpha error=0.05, power=0.8, an estimate standard deviation of MUC1 of 11 (thus variance (s^2)= 121) and a difference of ≥ 25 points in a scale ranging from 0-255 (i.e. a difference of 10%). The variance was obtained from a pilot study with 9 normal tubes stained with EPR 1023 and using ImageJ. These figures yielded a sample size of, at least, 3 cases in each group.

Increasing the difference to be identified between groups would reduce sample size, while the contrary would increase.

GraphPad Prism version 5 for Macintosh (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA) was used for statistical analysis, using unpaired Student's *t*-test method to compare the expression of MUC1 (final DAB intensity) in tubal epithelium of both groups, if data had a Gaussian distribution, otherwise, it would be used non-

parametric statistics. Additional statistical analysis with Pearson correlation was used to correlate age and MUC1 expression.

Results

Twenty-six samples were obtained (10 ectopic pregnancy; 16 controls). One control sample from the HMFG1 group was not possible to analyze due to technical problems. Characteristics of the samples are depicted in Table 2. Mean age between groups was significantly different. Pearson correlation analysis between age and MUC1 protein expression in controls was performed in order to identify a possible bias derived from this age difference. No significant difference was found (all $P>0.05$), as shown in Table 3.

MUC1 expression according to antibodies

As shown in Figure 1, MUC1 expression with EPR1023 antibody in ectopic pregnancy was significantly higher compared to controls (23.7 ± 13.6 vs. 8.5 ± 5.1 ; values are in mean \pm SD from cases of ectopic pregnancy and controls, respectively). Contrary, VPM564 expression was decreased in epithelium of Fallopian tubes with ectopic pregnancy ($P=0.005$, Student's t-test). No significant difference was found in immune expression of 214D4 and HMFG1 antibodies between cases of Fallopian tubes with or without ectopic pregnancy. MUC1 expression represented with HMFG1 was not reduced at the apical portion of the Fallopian tube mucosa in the presence of trophoblastic tissue.

MUC1 localization with 214D4 antibodies according to the menstrual phase of the cycle

214D4 antibody against MUC1 has a variable and not consistent immunolocalization in the epithelial cells of the mucosa of tubes with ectopic pregnancy, or according to the phases of the menstrual (Table 4 and Figure 2).

Discussion

From the data presented herein, it is possible to verify that the expression of certain antibodies against MUC1 is altered in the presence of ectopic pregnancy.

The MUC1 HMFG1 glycoform is a precursor to the 214D4 glycoform in the human uterine epithelial cell line (14). We were not able to identify any statistical difference of MUC 1 expression, using antibodies 214D4 and HMFG1, between Fallopian tubes with or without ectopic pregnancy. Actually, our results related to 214D4 antibody are different from those presented by Al-Azemi *et al.* (9). A possible explanation for this discrepancy could be related sample size. In Al-Azemi study, there is no mention of power analysis, and it seems that a study with a group with 3 or 4 cases is underpowered in a semi-quantitative outcome analysis. As it can be seen in the graph of Figure 1, 214D4 expression against MUC1 has great variability and using only 4 cases may lead to a false result. Another possibility is related to the semi-quantitative measurement of protein expression by immunohistochemistry, or what was considered as apical only, or intracellular. In their original paper from 2009, Al-Azemi *et al* reported that apical and intracellular expression of 214D4 were equally high (++) in luteal phase (9), but in 2012, the same group, published that the expression of 214D4 had a 50% reduction in the intracellular domain, compared to the apical portion (15).

As shown in Table 4, all samples had an apical expression of 214D4, which is in accordance to the results published by Refaat *et al.* (15).

EPR1023 and VPM654

VPM5654 is an antibody against a non-specific external domain of MUC1 and its expression is reduced in cases compared to controls (Figure 1). As expected, we were able to repeat our findings (8), but this time using a different DAB intensity quantification and different cases and controls. So far, we were not able to find any publication using this particular antibody. Different antibodies against MUC1 recognize different epitopes and these differences may explain the etiology of the implantation of the ectopic implantation. Shyu *et al* using a different antibody against MUC1 (clone VU4H5 and M2C5) demonstrated that trophoblastic invasion is restricted by the presence of MUC1 in placenta and decidua (16).

Was not possible to explain the increased expression of EPR1023 in cases of ectopic pregnancy. It may be related to abnormalities in second messenger signals, but this new finding needs further investigation.

This study has some positive aspects. The use of software ImageJ to quantify DAB intensity has been previously used by our group (17), it reduces bias and gives a consistent result. The only human factor related to this quantification was the selection of the image. This observation is in accordance to Helps *et al*, who used ImageJ for DAB expression in brain tissue (18). The ImageJ method was used, instead of other semi-quantitative methods, because was not possible to obtain a low inter- and intra-observer variability.

Nevertheless, this study has some limitations that must be addressed. A potential confounder factor was the difference of age between groups. So far, there are no data supporting the fact that age has any influence on MUC1 expression, and we have shown

in Table 3 that such correlation is weak (i.e., ≤ 0.2) and not significant. However further studies are necessary to confirm this finding. Immunohistochemical analysis was the single method used to identify MUC1 expression.

For negative external controls, a non-immune immunoglobulin of the same isotype and concentration as the primary monoclonal antibody was not used. This step would help to ensure that what appears to be specific staining was not caused by non-specific interactions of immunoglobulin molecules with the sample. Nonetheless, significant data presented herein have a negative expression. Furthermore, expression of MUC1 in Fallopian tubes has been confirmed by others authors (15). Neither mRNA, nor western blot was used to confirm our results. If they were used, laser capture would be a better method to analyze the luminal epithelium. Using whole tissue may lead to potential bias, because the surrounding tissue may not represent properly the site of implantation in the Fallopian tubes. Nevertheless, data on MUC1 mRNA expression has been presented by others and confirm that MUC1 is reduced in oviducts with ectopic pregnancy (15). It would be important to address some mechanistic aspects in order to identify if MUC1 expression was abnormal previously implantation, or if the embryo would induce the abnormal expression of MUC1, however this type of experiment has ethical issues.

In conclusion, this study revealed that some antibodies against MUC1 had their expression altered in tubes with ectopic pregnancy compared to normal tubes. The cytoplasmic domain of antibody EPR1023 has its immune expression increased, while the external domain of VPM654 is decreased. 214D4 expression has no variation in its localization according to the phase of the menstrual cycle. Further work is necessary to

determine if these alterations occur before embryo formation, or are consequences of the presence of the embryo.

References

1. Ho SB, Shekels LL, Toribara NW, Kim YS, Lyftogt C, Cherwitz DL et al. Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium. *Cancer Res* 1995;55:2681-90.
2. Gipson IK, Ho SB, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Zhan Q, Torlakovic E et al. Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biol Reprod* 1997;56:999-1011.
3. Burdick MD, Harris A, Reid CJ, Iwamura T, Hollingsworth MA. Oligosaccharides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines. *J Biol Chem* 1997;272:24198-202.
4. Horne AW, Lalani EN, Margara RA, Ryder TA, Mobberley MA, White JO. The expression pattern of MUC1 glycoforms and other biomarkers of endometrial receptivity in fertile and infertile women. *Mol Reprod Dev* 2005;72:216-29.
5. Aplin JD, Meseguer M, Simon C, Ortiz ME, Croxatto H, Jones CJ. MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochem Soc Trans* 2001;29:153-6.
6. Horne AW, Critchley HO. Mechanisms of disease: the endocrinology of ectopic pregnancy. *Expert Rev Mol Med* 2012;14:e7.
7. Shaw JL, Dey SK, Critchley HO, Horne AW. Current knowledge of the aetiology of human tubal ectopic pregnancy. *Hum Reprod Update* 2010;16:432-44.
8. Savaris RF, da Silva LC, Moraes Gda S, Edelweiss MI. Expression of MUC1 in tubal pregnancy. *Fertil Steril* 2008;89:1015-7.

9. Al-Azemi M, Refaat B, Aplin J, Ledger W. The expression of MUC1 in human Fallopian tube during the menstrual cycle and in ectopic pregnancy. *Hum Reprod* 2009;24:2582-7.
10. Carson DD. The cytoplasmic tail of MUC1: a very busy place. *Sci Signal* 2008;1:pe35.
11. Petrakou E, Murray A, Price MR. Epitope mapping of anti-MUC1 mucin protein core monoclonal antibodies. *Tumour Biol* 1998;19 Suppl 1:21-9.
12. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23:291-9.
13. Jekel JF, Elmore JG, Katz DL. Sample size, randomization, and probability theory. In *Epidemiology, Biostatistics & Preventive Medicine*, 1ed. Editado por Jekel JF, Elmore JG, Katz DL. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1996, p 160-71.
14. Wang P, Julian JA, Carson DD. The MUC1 HMFG1 glycoform is a precursor to the 214D4 glycoform in the human uterine epithelial cell line, HES. *Biol Reprod* 2008;78:290-8.
15. Refaat B, Simpson H, Britton E, Biswas J, Wells M, Aplin JD et al. Why does the fallopian tube fail in ectopic pregnancy? The role of activins, inducible nitric oxide synthase, and MUC1 in ectopic implantation. *Fertil Steril* 2012;97:1115-23.
16. Shyu MK, Lin MC, Liu CH, Fu YR, Shih JC, Lee CN et al. MUC1 expression is increased during human placental development and suppresses trophoblast-like cell invasion in vitro. *Biol Reprod* 2008;79:233-9.
17. Guedes Neto Ede P, Edelweiss MI, de Moraes GS, Cristovam Rdo A, Savaris RF. The influence of hydrosalpinx on endometrial elafin expression. *Fertil Steril* 2011;95:2673-5.

18. Helps SC, Thornton E, Kleinig TJ, Manavis J, Vink R. Automatic nonsubjective estimation of antigen content visualized by immunohistochemistry using color deconvolution. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012;20:82-90.

Table 1.

Primary antibody	Manufacture	Dilution	MUC1 domain identified
214D4 Mouse monoclonal	Technology, Stemcell, BC, CAN, The USA	1:100	Identifies peptides in the ectodomain of MUC1
EPR 1023 Rabbit monoclonal	Technology, Epitomics, CA, the USA	1:100	Identifies amino acids throughout the length of MUC1 and caboxi-terminal subunit 20 kDA
HMFG1 Mouse monoclonal	ab70475, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA	1:100	Identifies the peptide proline- glutamic acid- arginine-threonine in the protein ectodomain.
VPM654 mouse monoclonal	VP-M654 Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA	1:10	Identifies an external position of MUC1

Table 2. Characteristics of the sample.

Characteristics	Control (n=16)	Ectopic Pregnancy (n=10)	P value
Age [median(range)]	45 (28 to 65)	29.5 (22 to 60)	0.001 ^a
Skin color – n(%)			
White	12	8	0.6 ^b
Black	4	2	
Parity [median(range)]	1 (0 to 4)	1 (0 to 6)	0.6 ^a
Indication for surgery			
Leiomyoma	10		
Ovarian cyst	3		
Endometriosis of ovary	1		
Endometrial polyp	2		
Ectopic pregnancy		10	
Phases of the menstrual cycle			
Follicular	5		
Luteal	5		
Menopause	3		
Not available	3		

^a Mann-Whitney

^b Fisher's exact test

Table 3. Correlation between age of controls and DAB expression according to the antibody against MUC1. Analysis was performed with Pearson exact test, data had Gaussian distribution.

Antibody	Correlation (<i>r</i>)	<i>P</i>
214D4	0.08	0.3
EPR1023	0.16	0.5
HMFG1	0.2	0.4
VPM654	0.2	0.3

Table 4. Localization of 214D4 antibody in epithelial cells from mucosa of Fallopian tubes according to the phases of the menstrual cycle. Numbers represent individual cases. Any staining was considered as positive presence of 214D4.

Cycle phase	Control		Ectopic pregnancy	
	Apical	apical cytoplasm	Apical	apical cytoplasm
Follicular (n=5)	1	4		
Luteal (n=5)	1	4		
Menopause (n=3)	2	1		
Ectopic pregnancy (n=10)			3	7

* No data were available in 3 samples from the control group.

Figure 1 – Representative pictures of immunostaining of 214D4, EPR1023, HMFG1 and VPM654 in tubes with and without ectopic pregnancy are depicted in upper panel. Note that HMFG1 expression was present (black arrow) in the presence of trophoblastic tissue (arrow head). Bar scale represents 500µm. Individual values are represented in the graph. Statistical analysis was performed with Student’s t-test

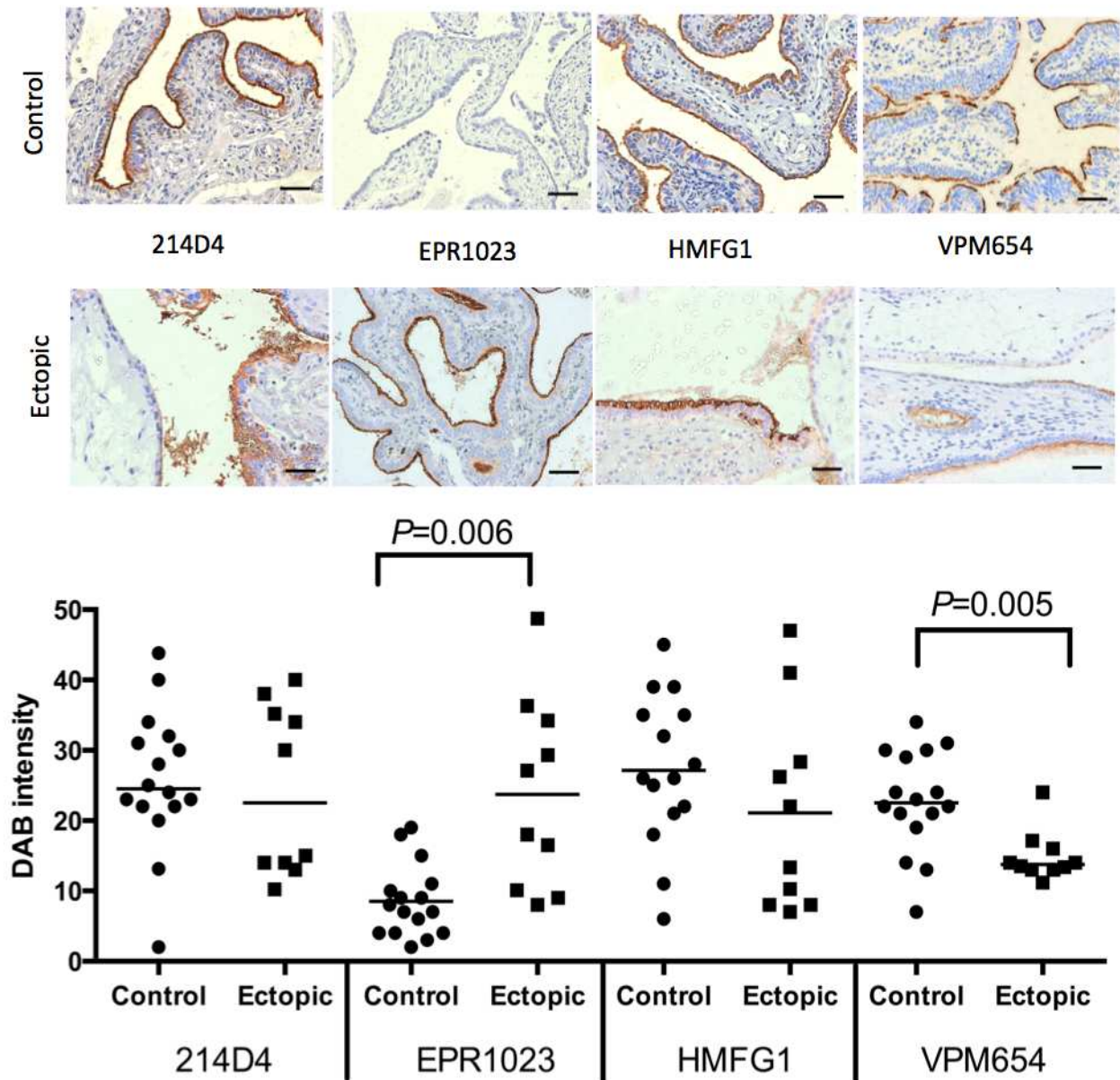
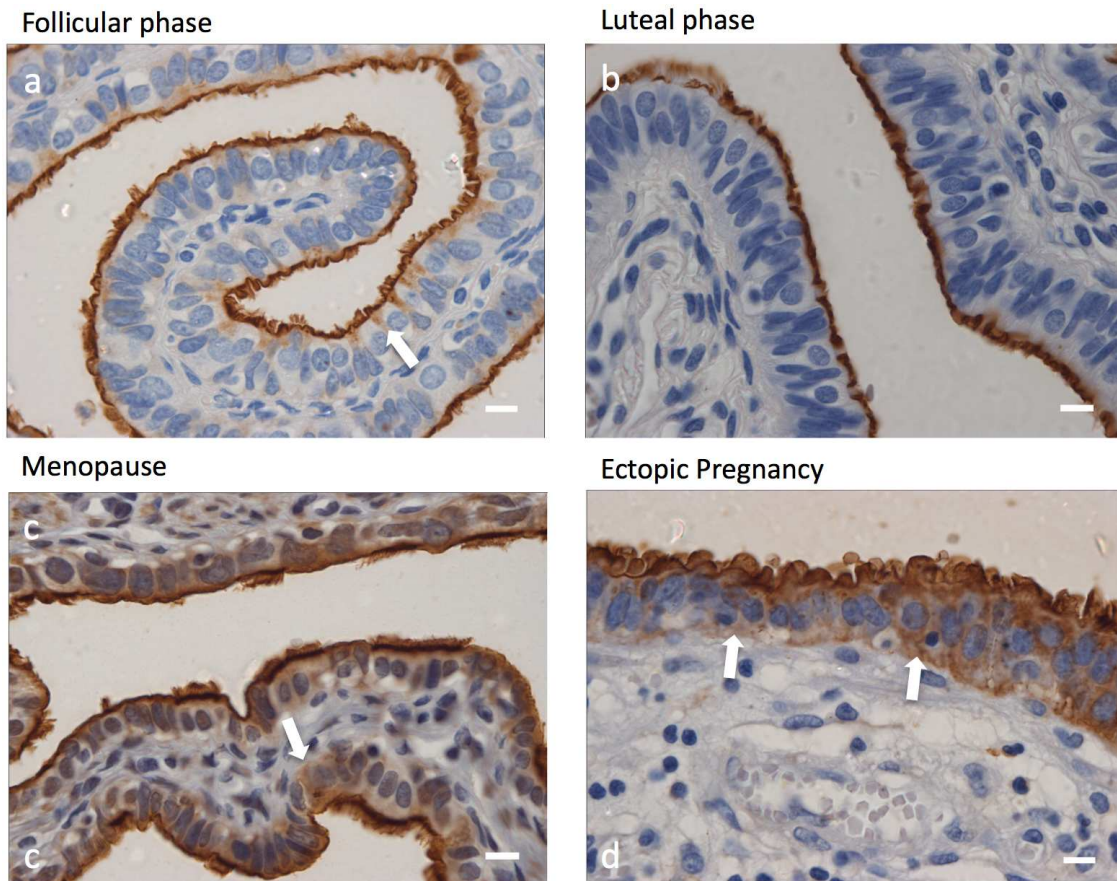


Figure 2 Immunolocalization of 214D4 antibody against MUC1 at different times of the menstrual and at the presence of an ectopic pregnancy. Scale bars represent 100µm



Artigo em Português

Introdução

MUC1 é uma proteína normalmente expressa na superfície apical de células epiteliais das glândulas mamárias, salivares, do esôfago, estômago, pâncreas, ductos biliares, do trato respiratório e urogenital (1). Na tuba de Falópio, somente a MUC1 é expressa (2). A MUC1 tem, entre outras funções, a de lubrificação, proteção contra agentes patogênicos e que uma propriedade de anti-adesiva (3, 4). Além disso, a expressão da MUC1 é constante em todos os níveis da tuba de Falópio e ao longo do ciclo menstrual (5). A imuno-reatividade da MUC1 é mais elevada no epitélio da tuba de Falópio e menor no epitélio da cavidade endometrial, o que sugere um gradiente a impedir a implantação de uma gravidez ectópica na tuba. Os mecanismos relacionados com a gravidez ectópica em humanos ainda precisam ser elucidados. Foi proposto que uma variedade de hormônios sexuais, interleucinas e glicoproteínas estão relacionadas com função anormal das tubas de Falópio que leva a gravidez ectópica (6, 7). Entre essas glicoproteínas, a MUC1 foi primeiramente investigada pelo nosso grupo (8), sendo seguido por outros pesquisadores (9). Nesses estudos, os pesquisadores descobriram que a expressão da MUC1 está reduzida, sugerindo uma redução da atividade anti-aderente no epitélio das tubas. Al-Azemi *et al.*, utilizou dois anticorpos contra o domínio externo da MUC1 (BC2 e 214D4), e quantificou a expressão dessas proteínas em uma escala semi-quantitativa, o que é propenso a subjetividade. Além disso, esses autores descreveram que a expressão do anticorpo 214D4 contra MUC1 é apenas apical durante a fase folicular do ciclo menstrual, e, durante a fase luteal, ela é apical e intracelular, mas os detalhes desses achados não foram relatados (9). O domínio C-terminal citoplasmático da MUC1 é uma região altamente conservada dessa mucina e é

envolvido na sinalização celular através de vários eventos de fosforilação (10). Devido à variabilidade da expressão dessas glicofomas, é importante testar diferentes marcadores, por exemplo, dentro do domínio citoplasmático e no domínio externo de uma maneira mais sofisticada para confirmar os resultados apresentados na literatura. Um painel de anticorpos monoclonais diferentes contra MUC1, tal como VPM654, EPR1023, HMFG, e 214D4, identificaria corretamente essas diferenças, pois diferentes domínios de MUC1 são identificados ao mesmo tempo (11). Portanto, o objetivo principal desse estudo foi comparar a expressão de MUC1 no epitélio das tubas uterinas de mulheres com e sem gravidez ectópica, a fim de melhor compreender os mecanismos envolvidos nesta doença. O objetivo secundário foi identificar melhor a localização da MUC1 na porção apical e intracelular das células, usando o anticorpo 214D4.

Materiais e métodos

Nesse estudo de caso-controle, os tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina foram obtidos a partir dos arquivos do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), nos casos entre 2010 e 2011. Um patologista experiente revisou as lâminas e confirmou o diagnóstico de gravidez ectópica e da normalidade das tubas de Falópio. As tubas de Falópio foram obtidas a partir de peças de histerectomia total para doenças benignas (leiomioma e sangramento uterino disfuncional). Casos com câncer e salpingite aguda foram excluídos. Os casos de gestações ectópicas foram obtidos a partir das peças cirúrgicas. O laudo da patologia com relação ao endométrio oriundo da peça cirúrgica, i.e, se o endométrio era proliferativo, secretor ou atrófico, juntamente com os dados clínicos obtidos do prontuário eletrônico, determinaram a fase do ciclo menstrual.

Imuno-histoquímica

A coloração imuno-histoquímica foi realizada utilizando o anticorpo primário contra MUC1 de acordo com a Tabela 1. Os controles externos negativos foram obtidos através da realização de coloração sem o anticorpo primário. Amostras reconhecidamente positivas para MUC1 (tecido mamário) foram utilizadas como controles externos positivos. Os cortes corados foram analisados com um microscópio BX51 da Olympus (Olympus Optical Co., Tóquio, Japão) conectada a uma câmera digital a cores/Q-Color 5 (Olympus). A lâmina foi avaliada usando várias imagens digitais, um campo microscópico = uma imagem. As imagens foram obtidas com uma objetiva de 4x ou 10x UPLanFI (resolução: 0,45), com uma resolução de tamanho de 2560x1920 pixels [resolução: 1mm = 590 pixels (40x), 1512 pixels (100x)], sob condições padronizadas de iluminação.

A expressão intracelular do anticorpo 214D4 foi definida como qualquer presença de coloração dentro das células epiteliais da tuba uterina, enquanto que a expressão apical foi considerada havia somente a coloração na porção apical da célula, sem a presença de coloração no interior das células epiteliais. Toda a amostra na lâmina foi considerada na análise.

ImageJ

Cada lâmina foi codificada e analisada cegamente através do software ImageJ v.4.0.1 (disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A região de interesse (ROI) consistiu numa secção transversal total da tuba de Falópio, incluindo apenas o epitélio da mucosa luminal. Depois de selecionar a ROI, a imagem foi submetida ao procedimento de análise chamado “deconvolução da cor”, escrito como um “*plugin*” para o software ImageJ, usando um vetor interno para a coloração de Hematoxilina e DAB (HDAB) (12). Esse *plugin* separa a imagem em três painéis diferentes através do processo de “deconvolução da cor”: um painel de hematoxilina somente, painel b) com

diaminobenzidina (DAB), e painel c) de fundo. O painel com a imagem de hematoxilina apenas foi selecionado e convertido em uma imagem binária. A partir dessa imagem binária, uma “máscara” foi criada para identificar a ROI, e esse arquivo foi salvo no gerenciador de ROI, dentro do software. Depois disso, o painel com DAB foi sobreposto com a “máscara” armazenada no gerenciador de ROI. A intensidade da coloração DAB e a área total foi medida pelo software, restando a intensidade média da imunocoloração DAB na ROI. Quando várias fotos foram tiradas a partir da mesma amostra, a média da intensidade do DAB foi calculada. A intensidade da média final do DAB foi calculada de acordo com a fórmula: $f = 255 - i$, onde f = intensidade DAB final, i = média intensidade DAB obtida a partir do software. A média da intensidade DAB varia de 0 (branco, sem expressão) a 255 (marrom escuro, a expressão mais alta).

Ética, cálculo do tamanho da amostra e análise estatística

O comitê de ética do HCPA, Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, aprovou o estudo (número 10-0448). Pelo fato de serem usados somente blocos de parafina a partir dos arquivos do Serviço de Patologia, o comitê de Ética institucional dispensou o consentimento informado por escrito, mas os autores do estudo tiveram que assinar uma declaração para preservar a privacidade dos pacientes, e todos os dados foram usados exclusivamente para presente estudo. O tamanho da amostra foi calculada de acordo com a fórmula descrita na literatura (13), utilizando os seguintes parâmetros: um erro alfa = 0,05 poder = 0,8, um desvio padrão de estimado para MUC1 de 11 (variância (s^2) = 121) e um diferença de ≥ 25 pontos em uma escala que varia entre 0-255 (isto é, uma diferença de 10%). A variância foi obtida a partir de um estudo piloto com 9 tubas normais corados com EPR1023 e usando ImageJ. Esses números renderam um tamanho de amostra de, pelo menos, 3 casos em cada

grupo. O aumento da diferença a ser identificada entre os grupos iria reduzir o tamanho da amostra, enquanto o contrário iria aumentar.

O software GraphPad Prism versão 5 para Macintosh (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, EUA) foi utilizado para a análise estatística, sendo que o teste *t* Student não-pareado foi utilizado para comparar a expressão da MUC1 (intensidade DAB final) no epitélio das tubas de ambos os grupos, se os dados tivessem uma distribuição Gaussiana, caso contrário, seria utilizada estatística não-paramétrica. A análise estatística adicional com o teste de Pearson foi realizada para correlacionar idade e a expressão de MUC1.

Resultados

Vinte e seis amostras foram obtidas (10 casos de gravidez ectópica, 16 controles). Uma amostra do controle do grupo HMFG1 não foi possível analisar devido a problemas técnicos. As características das amostras estão apresentadas na Tabela 2. Como houve uma diferença estatisticamente significativa entre as médias das idades dos dois grupos, uma análise de correlação de Pearson entre a idade e a expressão da proteína MUC1 foi realizada entre os controles, a fim de identificar uma possível viés resultante da diferença de idade (Tabela 3), a qual não se demonstrou significativa (todos $P > 0,05$).

Expressão de MUC1 de acordo com os anticorpos

Como demonstrado na Figura 1, a expressão de MUC1 com o anticorpo EPR1023 nos casos de gravidez ectópica foi significativamente maior em comparação com os controles ($23,7 \pm 13,6$ vs. $8,5 \pm 5,1$; $P=0,006$ – os valores representam a média \pm desvio padrão dos casos de gravidez ectópica e dos controles, respectivamente). A expressão do VPM564 foi diminuída no epitélio das tubas com a gravidez ectópica ($P = 0,005$, teste *t* de Student). Nenhuma diferença significativa foi encontrada na expressão dos anticorpos 214D4 e HMFG1 entre casos de tubas com ou sem gravidez ectópica.

A expressão da MUC1 representada pelo anticorpo HMFG1 não foi reduzida na porção apical da mucosa da tuba de Falópio, na presença de tecido trofoblástico.

Localização dos anticorpos 214D4 de acordo com a fase do ciclo menstrual

A imunocoloração do anticorpo 214D4 contra MUC1 apresentou uma imunolocalização variável e não coerente no epitélio das tubas uterinas com gravidez ectópica, ou de acordo com as fases do ciclo menstrual (Tabela 4 e Figura 2).

Discussão

A partir dos dados aqui apresentados, verifica-se que a expressão de certos anticorpos contra diferentes epitopos de MUC1 tem a sua expressão alterada no epitélio da mucosa das tubas com gravidez ectópica.

A glicofoma HMFG1 da MUC1 é precursora da glicofoma 214D4 na linha celular epitelial uterina humano (14). Não fomos capazes de identificar qualquer diferença estatística na expressão da MUC1, utilizando anticorpos 214D4 e HMFG1, ao comparar as tubas com ou sem gravidez ectópica. Na verdade, os resultados relacionados ao anticorpo 214D4 são diferentes daquelas apresentadas por Al-Azemi *et al.* (9). Uma possível explicação para esta discrepância pode estar relacionada com o *n* utilizado. No estudo de Al-Azemi, não há menção do cálculo do tamanho da amostra, e parece que um estudo com um *n* de 3 ou 4 dos casos não tem poder estatístico, usando uma análise com desfecho semi-quantitativo. Como pode ser visto no gráfico da Figura 1, a expressão do anticorpo 214D4 contra a MUC1 tem uma grande variabilidade e a utilização de apenas 4 casos pode levar a um resultado falso. Outra possibilidade está relacionada com a medição semi-quantitativa da expressão de proteínas por imunohistoquímica, ou os critérios para considerar o que é apenas apical, ou intracelular. Na sua publicação original de 2009, Al-Azemi *et al.* relataram que a expressão intracelular e apical de 214D4 estavam igualmente elevadas (+ +) na fase lútea (9), mas, em 2012, o

mesmo grupo, publicou que o anticorpo 214D4 tinha uma expressão 50% menor no domínio intracelular, em comparação com a porção apical (15). Como demonstrado na Tabela 4, todas as amostras apresentaram uma expressão apical de 214D4, o que está de acordo com os resultados publicados por Refaat *et al* (15).

EPR1023 e VPM654

VPM5654 é um anticorpo contra um domínio externo não-específico da MUC1 e a sua expressão é reduzida nos casos em comparação com os controles (Figura 1). Como esperado, repetimos os nossos resultados (8), mas desta vez usando uma quantificação diferente intensidade DAB e diferentes casos e controles. Até agora, não fomos capazes de encontrar qualquer publicação usando este anticorpo específico. A redução da expressão de MUC1 em trompas de Falópio podem explicar o implante ectópico. Essa diferenciação entre epitopos é corroborada pelo estudo de Shyu *et al*, os quais utilizando anticorpos diferentes contra MUC1 (clone VU4H5 e M2C5), demonstraram que a invasão trofoblástica é restringida pela presença de MUC1 na placenta e decídua (16). Não foi possível explicar o aumento da expressão de EPR1023 em casos de gravidez ectópica. Isso pode estar relacionado com anormalidade em mensageiros intracelulares, mas esse novo achado necessita de mais investigação.

Esse estudo tem alguns aspectos positivos. O uso do software ImageJ para quantificar a intensidade de DAB foi usado anteriormente pelo nosso grupo (17), e esse método reduz o viés de aferição e oferece resultados coerentes e reproduzíveis. O único fator humano relacionado com esta quantificação está relacionado com a seleção da imagem. Essa observação está de acordo com os resultados apresentados por Help, o qual utilizou o ImageJ para quantificar a expressão do DAB no tecido cerebral (18). O método ImageJ foi utilizado, em vez de outros métodos semi-quantitativos, porque não foi possível obter uma baixa variabilidade intra- e inter-observador.

No entanto, este estudo tem algumas limitações que devem ser abordadas. Um fator de confusão causado foi a diferença de idade entre os grupos. Até o momento, não existem dados que suportam o fato da idade ter qualquer influência na expressão da MUC1. Como demonstrado na Tabela 3, essa correlação é fraca (ou seja, $\leq 0,2$) e não é significativa. Porém mais estudos são necessários para confirmar esse achado. A análise imuno-histoquímica foi o único método utilizado para identificar a expressão de MUC1. Não foi utilizada uma imunoglobulina do mesmo isotipo tal como o anticorpo primário monoclonal, na mesma concentração, mas não-imune a MUC1 humana, como controle externo negativo. Esse passo poderia ajudar a garantir que o que parece ser a coloração específica não foi causada por interações não-específicas de moléculas de imunoglobulina com a amostra. No entanto, os dados aqui apresentados como significativos têm uma expressão negativa. Além disso, a expressão da MUC1 nas tubas de Falópio tem sido confirmada por outros autores (15). Não foram utilizadas outras técnicas como análise do RNAm, nem Westernblot para confirmar os resultados. Se fossem utilizados, captura com laser seria o melhor método para analisar o epitélio luminal. Utilizar todo o tecido poderia levar a um potencial viés, pois o tecido circundante não pode representar adequadamente o local de implantação nas tubas de Falópio. No entanto, os dados sobre a expressão do RNAm da MUC1 já foram apresentados adequadamente por outros autores e confirmam que a MUC1 está reduzida em tubas uterinas com gravidez ectópica (15). Seria importante para identificar alguns aspectos mecanísticos, a fim de identificar se MUC1 expressão era anormal anteriormente a implantação do embrião, ou se o mesmo induziria a expressão anormal da proteína MUC1, no entanto esse tipo de experimento tem problemas éticos. Em conclusão, esse estudo demonstrou que alguns anticorpos contra MUC1 tem a sua expressão alterada nas tubas com gravidez ectópica, quando comparadas com os tubas

normais. O domínio citoplasmático de anticorpo EPR1023 tem a sua expressão imunológica aumentada, enquanto que o domínio externo de VPM654 está diminuída. A imunolocalização do anticorpo 214D4 não varia de acordo com a fase do ciclo menstrual. Outros estudos são necessários para determinar se estas alterações ocorrem antes da formação do embrião, ou são consequências da presença do embrião.

Referências

1. Ho SB, Shekels LL, Toribara NW, Kim YS, Lyftogt C, Cherwitz DL et al. Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium. *Cancer Res* 1995;55:2681-90.
2. Gipson IK, Ho SB, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Zhan Q, Torlakovic E et al. Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biol Reprod* 1997;56:999-1011.
3. Burdick MD, Harris A, Reid CJ, Iwamura T, Hollingsworth MA. Oligosaccharides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines. *J Biol Chem* 1997;272:24198-202.
4. Horne AW, Lalani EN, Margara RA, Ryder TA, Mobberley MA, White JO. The expression pattern of MUC1 glycoforms and other biomarkers of endometrial receptivity in fertile and infertile women. *Mol Reprod Dev* 2005;72:216-29.
5. Aplin JD, Meseguer M, Simon C, Ortiz ME, Croxatto H, Jones CJ. MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochem Soc Trans* 2001;29:153-6.
6. Horne AW, Critchley HO. Mechanisms of disease: the endocrinology of ectopic pregnancy. *Expert Rev Mol Med* 2012;14:e7.
7. Shaw JL, Dey SK, Critchley HO, Horne AW. Current knowledge of the aetiology of human tubal ectopic pregnancy. *Hum Reprod Update* 2010;16:432-44.

8. Savaris RF, da Silva LC, Moraes Gda S, Edelweiss MI. Expression of MUC1 in tubal pregnancy. *Fertil Steril* 2008;89:1015-7.
9. Al-Azemi M, Refaat B, Aplin J, Ledger W. The expression of MUC1 in human Fallopian tube during the menstrual cycle and in ectopic pregnancy. *Hum Reprod* 2009;24:2582-7.
10. Carson DD. The cytoplasmic tail of MUC1: a very busy place. *Sci Signal* 2008;1:pe35.
11. Petrakou E, Murray A, Price MR. Epitope mapping of anti-MUC1 mucin protein core monoclonal antibodies. *Tumour Biol* 1998;19 Suppl 1:21-9.
12. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23:291-9.
13. Jekel JF, Elmore JG, Katz DL. Sample size, randomization, and probability theory. In *Epidemiology, Biostatistics & Preventive Medicine*, 1ed. Editado por Jekel JF, Elmore JG, Katz DL. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1996, p 160-71.
14. Wang P, Julian JA, Carson DD. The MUC1 HMFG1 glycoform is a precursor to the 214D4 glycoform in the human uterine epithelial cell line, HES. *Biol Reprod* 2008;78:290-8.
15. Refaat B, Simpson H, Britton E, Biswas J, Wells M, Aplin JD et al. Why does the fallopian tube fail in ectopic pregnancy? The role of activins, inducible nitric oxide synthase, and MUC1 in ectopic implantation. *Fertil Steril* 2012;97:1115-23.
16. Shyu MK, Lin MC, Liu CH, Fu YR, Shih JC, Lee CN et al. MUC1 expression is increased during human placental development and suppresses trophoblast-like cell invasion in vitro. *Biol Reprod* 2008;79:233-9.

17. Guedes Neto Ede P, Edelweiss MI, de Moraes GS, Cristovam Rdo A, Savaris RF. The influence of hydrosalpinx on endometrial elafin expression. *Fertil Steril* 2011;95:2673-5.
18. Helps SC, Thornton E, Kleinig TJ, Manavis J, Vink R. Automatic nonsubjective estimation of antigen content visualized by immunohistochemistry using color deconvolution. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012;20:82-90.

Table 1.

Anticorpo primário	Fábricas	Diluição	MUC1 domínio identificado
214D4 Monoclonal de camundongo	Technology, Stemcell, BC, CAN, The USA	1:100	Identifica peptídeos no ectodomínio de MUC1
EPR 1023 Monoclonal de coelho	Technology, Epitomics, CA, the USA	1:100	Identifica aminoácidos ao longo do comprimento de MUC1 e a subunidade carboxi-terminal de 20 kDA
HMFG1 Monoclonal de camundongo	ab70475, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA	1:100	Identifica o peptídeo prolina-acido glutâmico-agenina-treonina no ectodomínio da proteína.
VPM654 Monoclonal de camundongo.	VP-M654 Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA	1:10	Identifica a posição externa de MUC1.

Tabela 2. Características da amostra.

Características	Controle (n=16)	Gravidez Ectópica (n=10)	P valor
Idade [mediana(intervalo)]	45 (28 to 65)	29.5 (22 to 60)	0.001 ^a
Cor da pele – n(%)			
Branco	12	8	0.6 ^b
Preto	4	2	
Paridade [mediana(intervalo)]	1 (0 to 4)	1 (0 to 6)	0.6 ^a
Indicação de cirurgia			
Leiomioma	10		
Cisto ovariano	3		
Endometriose de ovário	1		
Pólipo endometrial	2		
Gravidez ectópica		10	
Fases do ciclo menstrual			
Folicular	5		
Luteal	5		
Menopausa	3		
Não disponível	3		

^a Mann-Whitney

^b Fisher's exact test

Tabela 3. Correlação entre a idade dos controles e a expressão DAB de acordo com as anticorpos contra MUC1. A análise foi realizada com o teste exato de Pearson, os dados tinham distribuição gaussiana.

Anticorpo	Correlação (<i>r</i>)	<i>P</i>
214D4	0.08	0.3
EPR1023	0.16	0.5
HMFG1	0.2	0.4
VPM654	0.2	0.3

Tabela 4. Localização do anticorpo 214D4 nas células epiteliais da mucosa da tuba de Falópio de acordo com as fases do ciclo menstrual. Os números representam casos individuais. Foi considerada positiva qualquer coloração na presença de 214D4.

Fases do Ciclo	Controle		Gravidez Ectópica	
	apical	apical citoplasma	apical	apical citoplasma
Folicular (n=5)	1	4		
Luteal (n=5)	1	4		
Menopausa (n=3)	2	1		
Gravidez Ectópica (n=10)			3	7

* Não haviam dados disponíveis em três amostras de um grupo de controle.

Figura 1 – Figura representativa de imunocoloração de 214D4, EPR1023, HMFG1 e VPM654 nas tubas com e sem gravidez ectópica são representadas no painel superior. Note-se que a expressão de HMFG1 estava presente (seta preta), na presença de tecido trofoblástico (cabeça da seta). A barra da escala representa 500µm. Os valores individuais estão representados no gráfico. A análise estatística foi realizada com o teste T- Student.

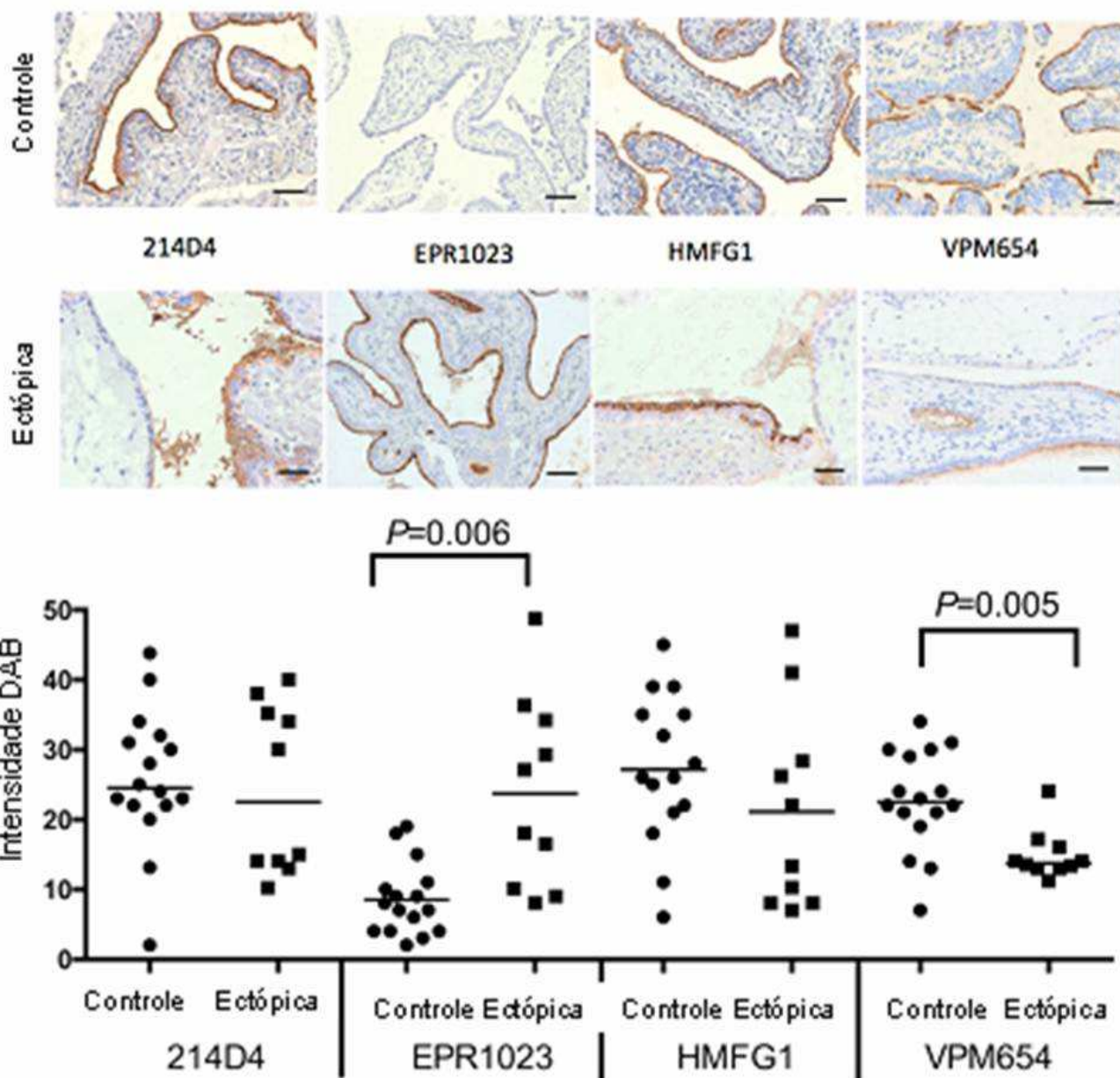
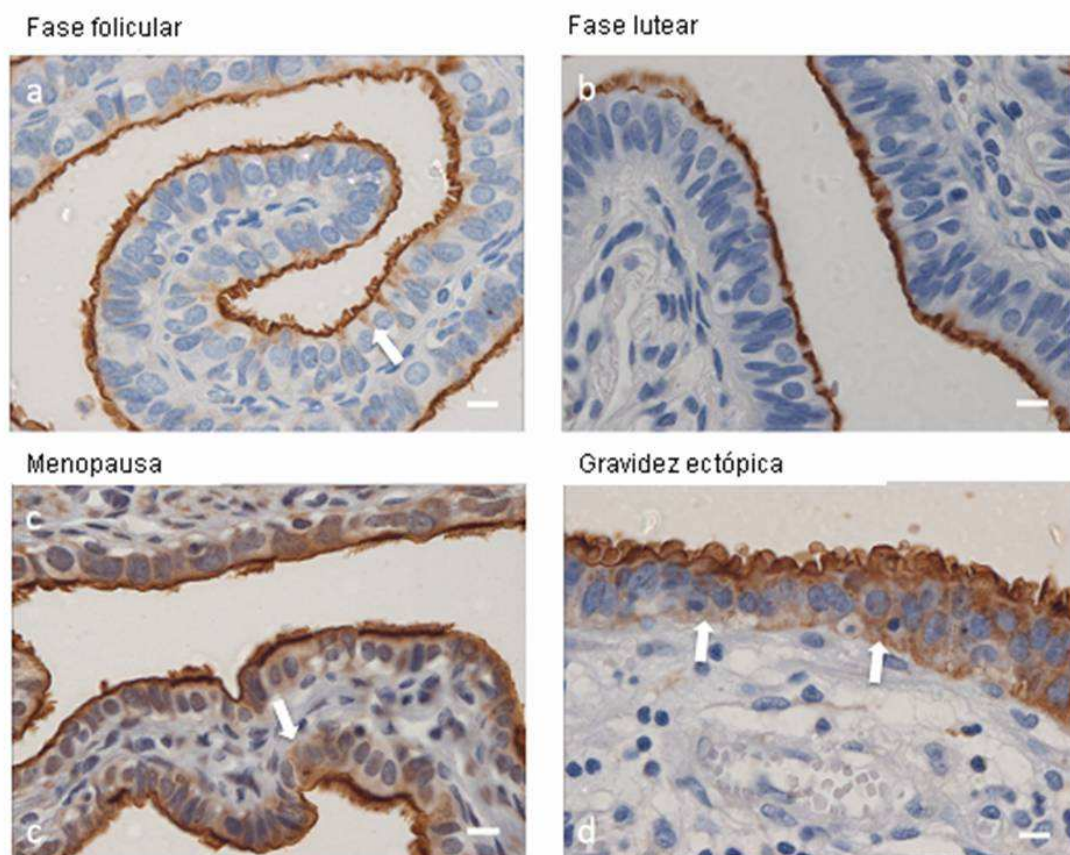


Figura 2 Imunolocalização de anticorpos 214D4 contra MUC1 em diferentes momentos do ciclo menstrual e na presença de uma gravidez ectópica. Barras da escala representam 100 μ m.



Anexo

Confirmação da submissão para revista internacional

Fertil Steril Para: Ricardo Savaris , Ricardo Savaris A manuscript number has been assigned to F and S16008	18 de abril de 2013 12:49 Ocultar Detalhes
<p>Dear Dr. Savaris,</p> <p>Your submission to Fertility and Sterility, entitled "MUC1 (VPM654 and EPR1023) expression in mucosa of tubes with ectopic pregnancy is altered", has been assigned the following manuscript number: F and S16008.</p> <p>You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System of the journal as an author.</p> <p>The URL is http://ees.elsevier.com/fns/.</p> <p>Thank you for submitting your work to this journal.</p> <p>Sincerely,</p> <p>Fertility and Sterility Editorial Office</p>	