

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Expressão da elafina em tubas uterinas com gravidez ectópica

Autora: Melina Grudzinski

Orientador: Ricardo Francalacci Savaris

Tese de Doutorado

2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Expressão da elafina em tubas uterinas com gravidez ectópica

Autora: Melina Grudzinski

Orientador: Ricardo Francalacci Savaris

Tese de Doutorado

2013

Grudzinski, Melina  
Expressão da elafina em tubas uterinas com  
gravidez ectópica / Melina Grudzinski. -- 2013.  
82 f.

Orientador: Ricardo Francalcci Savaris .

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

1. Elafina. 2. Gravidez ectopica. 3. Tubas  
uterinas. I. Francalcci Savaris , Ricardo, orient.  
II. Título.

## Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Ricardo Savaris, pela orientação; pelo seu rigor científico e disciplina, sem os quais este trabalho não teria sido escrito. Por suas críticas inteligentes, precisas e incisivas, por sua disponibilidade infinita dentro de uma agenda atribulada e pelo incentivo. Um agradecimento especial a sua esposa, Michele, por me receber em sua casa inúmeras vezes tarde da noite.

## ÍNDICE

**Abreviaturas 7**

**INTRODUÇÃO 8**

**REVISÃO DA LITERATURA 9**

**Sistema Imune Inato 9**

Elafina 15

Estrutura 17

Expressão e ativação da Elafina 18

Funções da Elafina 19

Elafina em diferentes tecidos e órgãos 20

Elafina no Trato Genital Feminino 21

Elafina e o ciclo menstrual 23

A Elafina no pós-parto 24

Uso clínico da elafina recombinante 25

Gravidez ectópica 26

Fatores de risco para a Gravidez Ectópica 26

Localização da gravidez ectópica 27

Fisiologia 28

Transporte do embrião 28

Elafina, tuba uterina e gravidez ectópica 29

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 30**

**Justificativa 49**

<b>Objetivo</b>	<b>50</b>
<b>Artigo em Inglês</b>	<b>51</b>
<b>Artigo em Português</b>	<b>66</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>82</b>

## **Abreviaturas**

APCs – *Antigen Presenting Cell*

ESI – Elastase Specific Inhibitor

GE – gravidez ectópica

HLE – Human Leucocyte Elastase

NE - elastase neutrofilica

NK - Natural Killer

PAMPs - *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PI3 - Peptidase Inhibitor 3

PRRs - *Pattern Recognition Receptors*

SKALP – SKin-derived AntiLeuko-Protease)

SLPI- Secretory Leukocyte Protease Inhibitor

SPAI-2 - *sodium/potassium ATPase inhibitor*)

Trappin - TRansglutaminase substrate and WAP domain containing Protein

TLRs – Toll Like Receptors

WAP - whey acidic protein

WAP3 - whey acidic proteins 3

## INTRODUÇÃO

O trato genital feminino apresenta características únicas. Além de ter a função reprodutiva, a sua exposição a agentes externos permite que o mesmo seja uma porta de entrada para os processos infecciosos <sup>1;2</sup>. Conseqüentemente, esses processos infecciosos geram alterações no trato genital feminino que podem ser fatores de risco para outras doenças que prejudicam a sua função reprodutiva <sup>3;4</sup>.

Os mecanismos de defesa inatos fazem parte da primeira linha de defesa no combate a infecção através do processo inflamatório <sup>2</sup>. O Sistema Imune Inato e Adaptativo estão intimamente relacionados com a homeostase do processo inflamatório, onde a destruição do agente agressor deve ter um efeito colateral pequeno na destruição do tecido sadio. A elafina e o inibidor da protease secretada por leucócitos são algumas das proteínas envolvidas no processo de proteção <sup>5;6</sup>.

A gravidez ectópica é uma condição anômala onde a implantação do embrião ocorre fora do útero em 1 a 2% das gestações, com mortalidade entre 3 e 4% <sup>7</sup>. Os mecanismos que facilitam essa implantação são objetos de estudo <sup>8-10</sup>. Os processos inflamatórios na tuba uterina estão entre os fatores de risco para a implantação ectópica <sup>11</sup>. Portanto, faz-se necessário verificar se existe uma associação entre a diminuição das defesas inatas da tuba uterina e a presença da gravidez ectópica. Ainda está para ser esclarecido se essa associação é causa ou consequência da presença da gravidez ectópica. O presente estudo irá rever os conceitos do sistema imune inato, focando sobre a proteína elafina, alguns mecanismos da etiologia da gravidez ectópica nas tubas uterinas, culminado com a investigação da associação da elafina nos casos de gravidez tubária em humanos.

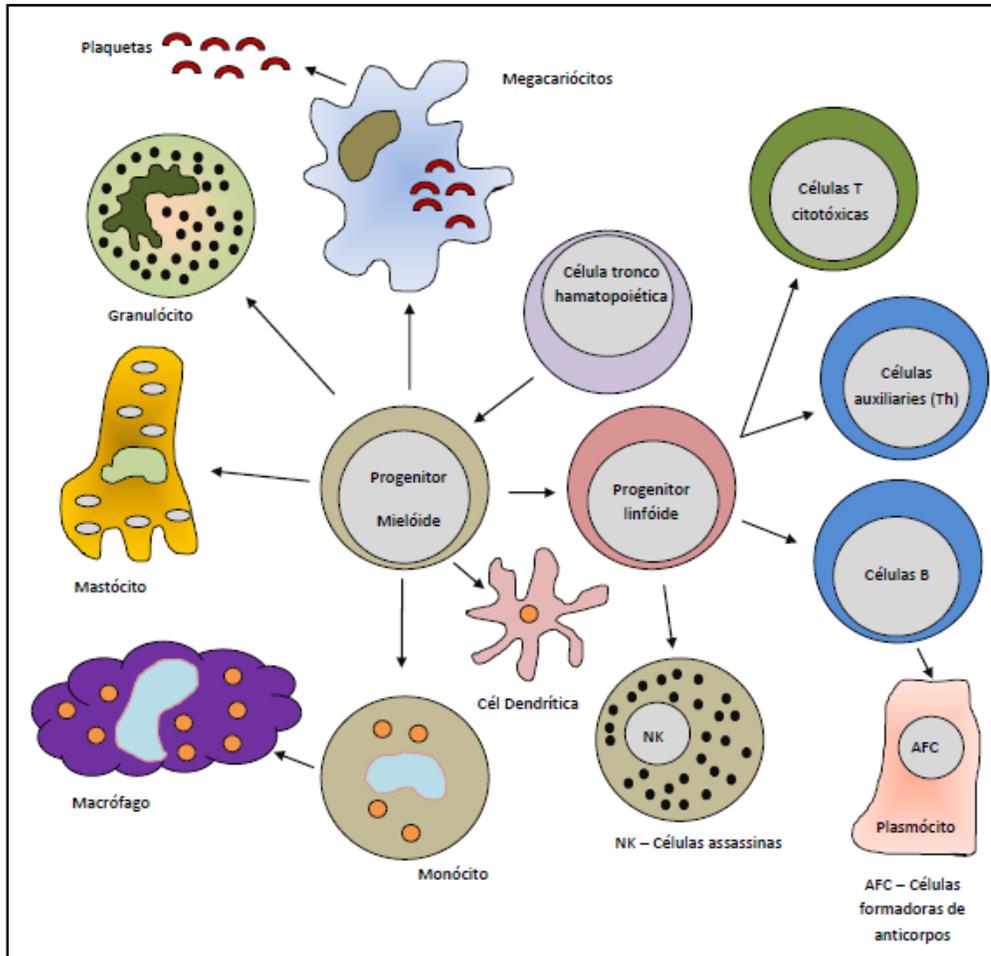
# REVISÃO DA LITERATURA

## Sistema Imune

É definido como *imunidade* a capacidade que o organismo possui de resistir e responder a corpos estranhos. O sistema imune é composto por células que são recrutadas para defender qualquer agressão contra a manutenção da homeostase do corpo humano. A reação coordenada das células do sistema imune em resposta a determinado estímulo é conhecida como *resposta imune* <sup>12-14</sup>.

A proteção do organismo pelo sistema imune é realizada através de duas vias distintas porém interconectadas – *Sistema Adaptativo, Adquirido ou Específico* e o *Sistema Inato, Natural ou Não Específico*. O Sistema adaptativo corresponde a segunda linha de defesa do organismo, é uma reação não-imediata ao agressor, é específica ao antígeno e possui memória imunológica, reagindo mais rapidamente à exposição subsequente do mesmo organismo; o *Sistema Inato* é a primeira linha de defesa do corpo humano, apresenta uma rápida capacidade de reação, não é antígeno-específico, pois reage da mesma maneira para uma variedade de organismos, e não tem memória imunológica <sup>13;15</sup>.

Todas as células do sistema imune se originam de uma célula tronco hematopoiética que origina duas linhagens principais: uma de células mielóides progenitoras e uma de células linfóides progenitoras, conforme Figura 1 <sup>16</sup>. Esses dois progenitores originam células mielóides (monócitos, macrófagos, células dendríticas, megacariócitos e granulócitos) e células linfóides (células T, células B e células assassinas naturais), respectivamente <sup>13;17</sup>.



**Figura 1** – Origem das células do Sistema Imune. O sistema imunológico é um sistema complexo e difuso contendo diversos tipos de células. Todas as células do sistema imune são derivadas a partir de um único precursor, e se diferenciam por meio de uma série de eventos e de sinalizações; cada nova célula diferenciada apresenta seu próprio formato e funcionalidade. Adaptado de Mayer et al.<sup>20</sup>

Os principais mecanismos da imunidade inata compreendem barreiras físicas (pele, camadas epiteliais internas, movimento dos intestinos, oscilação dos cílios bronco-pulmonares), químicas (pH, ácidos graxos do suor, lisozima e fosfolipase encontrados

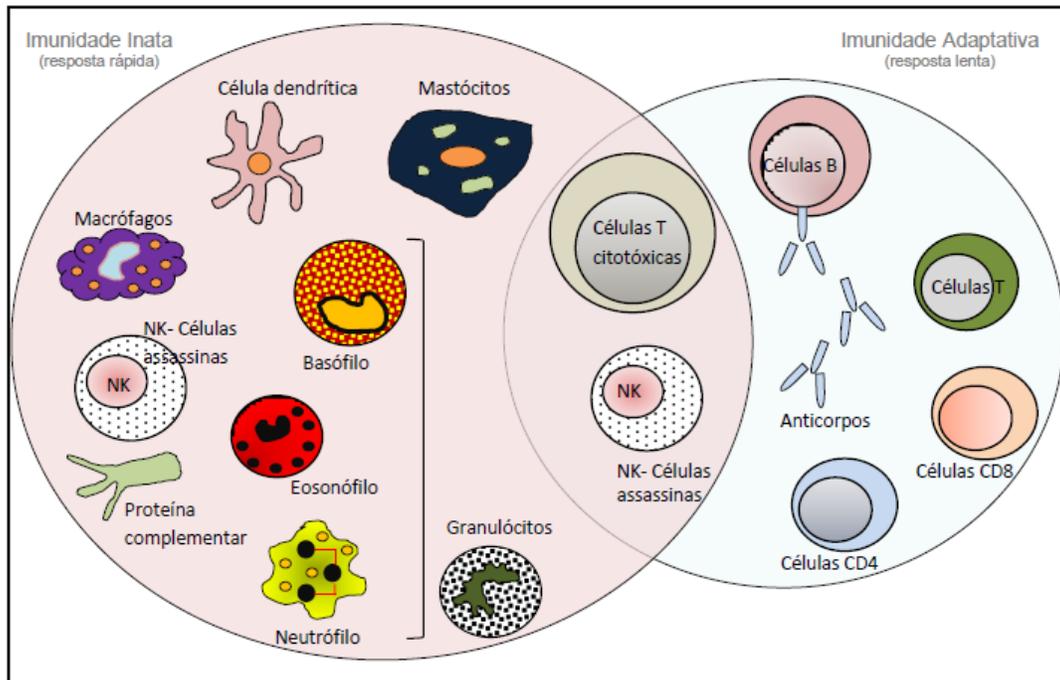
na lágrima, saliva e secreções), biológicas (flora normal da pele e do trato gastrointestinal), celulares (linfócitos, fagócitos) e moleculares (liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, bem como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas) <sup>15-17;19;21;22</sup>.

Essas células constituem os componentes celulares dos sistemas imune inato e adaptativo, conforme a Tabela 1<sup>18</sup>.

**Tabela 1.** Células e moléculas solúveis do sistema imunológico. De Wira *et al.* <sup>2</sup>

Componente	Imunidade Inata	Imunidade Adquirida
Células	Fagócitos (cél. dendríticas, macrófagos e neutrófilos) Células natural killer Mastócitos, basófilos e eosinófilos	Linfócitos T, B e NK/T Cél dendríticas ou apresentadoras de antígenos
Moléculas solúveis	Complemento Proteínas da fase aguda Citocinas Quimiocinas	Anticorpos Citocinas Quimiocinas

As principais células efetoras da imunidade inata nos mamíferos são: células dendríticas, fagocitárias (macrófagos e neutrófilos), bem como células assassinas naturais (NK, *natural killers*), conforme Figura 2 <sup>15;17;19</sup>.



**Figura 2** - O sistema imune - Embora os sistemas sejam divididos em imunidade inata e adaptativa, os diferentes tipos de células interagem. Por exemplo, a diferenciação de linfócitos T e desenvolvimento da especificidade depende apresentação do antígeno pelas do sistema inato. Adaptado de Mayer et al <sup>20</sup>.

De acordo com a composição molecular de cada microrganismo, patogênico ou não, existem estruturas semelhantes que são reconhecidas pelo sistema inato, os chamados padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, *Pathogen Associated Molecular Patterns*), e os receptores de PAMPs, que são os chamados receptores de reconhecimento padrão (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*)<sup>2;23;24</sup>. Um PRR particular pode reconhecer um padrão molecular que deve estar presente em uma quantidade de patógenos diferentes permitindo que o receptor identifique uma diversidade de patógenos <sup>18;24</sup>. Dessa forma, moléculas que não são próprias do hospedeiro, como por exemplo os lipopolissacarídeos das paredes bacterianas, são

reconhecidas como não-próprias por meio dos PRRs <sup>24;25</sup>. Os PRRs podem ser divididos em três classes, conforme Tabela 2 <sup>26</sup>.

**Tabela 2.** Diferentes classes de PRRs e sua atuação <sup>26</sup>

Classe de Receptores de reconhecimento padrão	Atuação
Secretados	Atuam na opsonização e ativação do complemento. Ex.: Proteína ligadora de manose.
Endocíticos	Presente na superfície dos fagócitos. Permite a fagocitose e a apresentação de antígeno (associado ao Complexo Principal de Histocompatibilidade).
Sinalizadores	Ativam as vias de transdução de sinal. Induzem a expressão de vários genes responsáveis pela produção de citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias.

Embora a pele humana seja constantemente exposta a uma grande variedade de potenciais agentes patógenos, a infecção ocorre raramente <sup>27</sup>. Uma vez que os micróbios tenham ultrapassado as barreiras físicas, como o epitélio do trato intestinal ou da pele, eles são reconhecidos pelos receptores, os chamados *toll like* (TLRs, *Toll Like Receptors*), que por sua vez propagam o sinal ativando as respostas imunes celulares

como a liberação das defensinas, dos inibidores da protease secretória dos leucócitos, elafina e outros, considerados enzimas anti-proteases<sup>16;28-32</sup>.

Os receptores *toll like* representam uma família de PRRs presentes na membrana plasmática e no endossoma das células apresentadoras de antígenos (APCs), expressos em todos os seres vertebrados e capazes de reconhecer componentes de bactérias, vírus e fungos, alertando o sistema imune para presença de infecções microbianas<sup>28</sup>. Nos seres humanos, foram identificados onze tipos diferentes de receptores *toll like*, cada um com uma especificidade diferente<sup>33</sup>.

As primeiras células a migrar para sítios de infecção são os neutrófilos, e sua estrutura está diretamente adaptada às numerosas funções desempenhadas por essa célula<sup>34;35</sup>.

Um dos componentes estruturais mais importantes dos neutrófilos são os grânulos citoplasmáticos, classificados em três categorias de acordo com suas características ultra-estruturais e citoquímicas: grânulos primários ou azurófilos, grânulos específicos ou secundários e grânulos terciários<sup>36</sup>. A liberação do conteúdo dos grânulos para o meio extracelular ocorre durante o movimento celular e em resposta a algum estímulo específico. Os grânulos azurófilos ou primários armazenam três tipos de proteases: neutrófilo elastase, catepsina G e proteinase-3<sup>37-39</sup>.

As proteases (proteínases, peptidases ou enzimas proteolíticas) são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas; subdividem-se de acordo como seu sítio de ação, em exopeptidases (clivam peptídeos terminais), e endopeptidases (clivam distantemente dos terminais dos substratos)<sup>38;40;41</sup>. A família de protease mais bem caracterizada e mais fisiologicamente versátil é a das serino proteases, exemplificada pelas enzimas pancreáticas tripsina, quimotripsina, elastase e calicreína<sup>41-43</sup>.

Os neutrófilos, após a sua ativação, causam considerável dano colateral ao tecido do hospedeiro, como lesões celulares e epiteliais, em particular pela liberação de numerosas proteases, como a elastase neutrofílica (NE), catepsinas, proteinase-3, metaloproteases, e cisteína proteases<sup>6;34;44-46</sup>. As proteases são enzimas secretadas dentro do fagossoma e com intensa capacidade de destruição<sup>40;41</sup>. Essas enzimas são somente liberadas no meio extracelular em circunstância de necessidade extrema, quando há concentrações elevadas de agentes patógenos. A consequência desta liberação é a destruição sem controle do tecido adjacente<sup>47</sup>.

A elastase leucocitária humana (HLE, *Human Leucocyte Elastase*) é uma das várias proteases liberadas pelos neutrófilos na destruição tecidual e na infecção microbiana; suas principais funções fisiológicas no meio intracelular são a degradação de bactérias e complexos imunológicos fagocitados pelos neutrófilos, a fragmentação de receptores, degradação de proteínas plasmáticas, ativação de linfócitos e proteases e a inativação de inibidores endógenos<sup>48</sup>. A atividade proteolítica da HLE é controlada por inibidores endógenos, entre eles, estão o inibidor secretório da proteinase leucocitária (SLPI, *Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*) e a elafina<sup>49;50</sup>. As antiproteases têm sido classificadas “sistêmicas” ou “de alarme”, dependendo do seu local de produção<sup>5;51</sup>. O próximo tópico abordará em mais detalhes o objeto dessa tese, a elafina.

### ***Elafina***

Em 1989, Araki e colaboradores descreveram uma proteína com atividade inibitória para a bomba de sódio e potássio, a partir do duodeno de porcos, e essa proteína recebeu o nome de inibidor de sódio/potássio/ATPase ou SPAI-2 (SPAI-2 - *sodium/potassium ATPase inhibitor*)<sup>52</sup>. SPAI-2 apresentava semelhança estrutural com o inibidor

secretório da proteinase leucocitária (SLPI), a qual faz parte da família de genes WAP (WAP, *whey acidic protein*)<sup>53</sup>.

Em 1990, dois grupos independentes descreveram um inibidor da elastase a partir de lesões psoriáticas, Wiedow *et al.* atribuíram ao novo inibidor o nome “Elafina” (por sua função de inibir a elastase), enquanto Schalkwijk *et al.* conferiram à nova descoberta o nome “Antileucoprotease derivada da pele” (SKALP, *SKin-derived AntiLeuko-Protease*), dada a sua origem na pele<sup>54;55</sup>. As sequências de aminoácidos da elafina e da SKALP indicaram que ambas representavam a mesma molécula, pertenciam à família I17 (classificação de acordo com a sequência de aminoácidos) e que essa proteína era homóloga à SLPI<sup>56-60</sup>. Essas proteínas são caracterizadas por apresentarem baixo peso molecular, serem secretadas e possuírem um núcleo proteico com 4 pontes dissulfeto (domínio WAP)<sup>61</sup>. A ligação dissulfeto tem a função de estabilizar o enrolamento proteico, particularmente em proteínas que são excretadas para o meio extracelular<sup>62</sup>. Como a maioria dos ambientes intracelulares possui um caráter redutor, as ligações dissulfureto são, com algumas exceções, instáveis no citoplasma<sup>63</sup>.

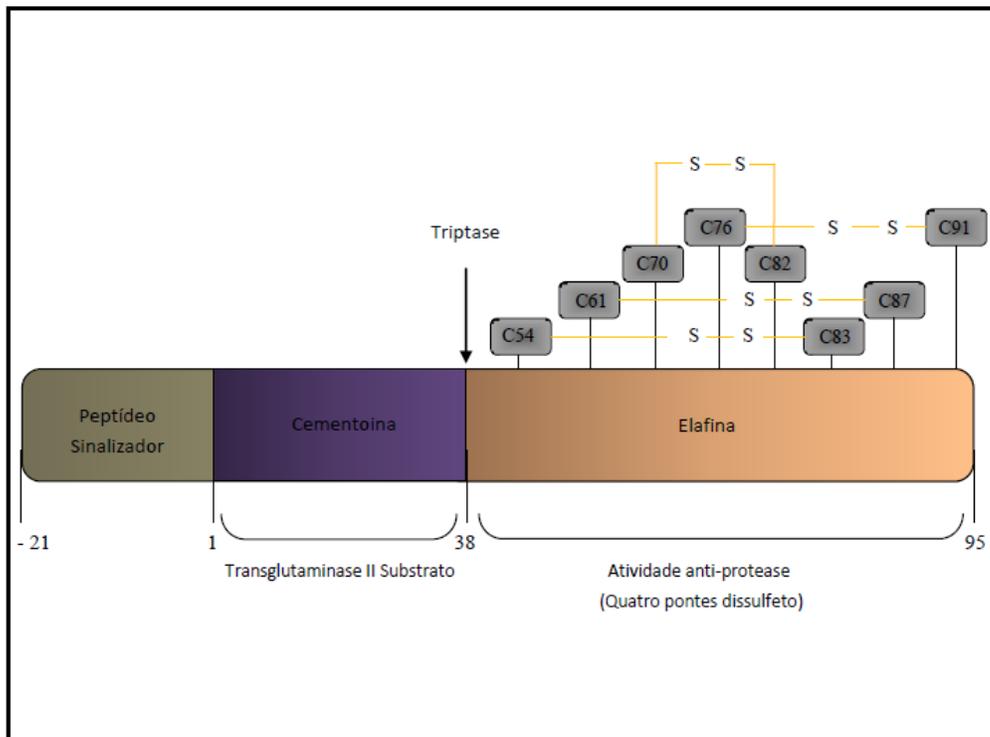
Devido à diversidade das funções das proteínas WAP, seus membros são agrupados dentro de famílias baseados na sua funcionalidade, por exemplo, SLPI e elafina foram agrupados em uma família denominada antileucoproteinase<sup>49;64;65</sup>. A elafina, denominação corrente, também é conhecida como Inibidor da peptidase 3 (PI3, *Peptidase Inhibitor 3*), Inibidor específico da elastase (ESI, *Elastase Specific Inhibitor*), Proteína ácida do soro do leite (WAP3, *whey acidic proteins 3*) e cementoína, sendo PI3 seu símbolo oficial<sup>61;66</sup>.

As elafinas são encontradas na circulação, ou estão localizadas em diferentes células e tecidos em altas concentrações; possuem uma função importante na proteção contra a proteólise não desejada de algumas enzimas<sup>67;68</sup>.

## **Estrutura**

A pré-elafina ou trapina 2 é uma proteína não glicosilada (sem moléculas de glicose) de 9,9 kDa (kilodaltons), e 95 aminoácidos organizados em dois domínios<sup>69-71</sup>. O 1º domínio, N-terminal, não apresenta atividade inibitória e é composto por 38 aminoácidos contendo motivos repetidos e variações da sequência Gly-Gln-Asp-Pro-Val-Lys<sup>72;73</sup>. Esse domínio é chamado de cementoína e é o substrato para a enzima transglutaminase. O 2º domínio, responsável pela inibição da elastase, C-terminal, é a elafina, com 6 kDa, constituída por um domínio WAP com 40% de homologia ao SLPI e com atividade inibitória<sup>59;66;73;74</sup>. A ruptura entre a porção pré-elafina e elafina é mediada pela enzima triptase, conforme ilustração da Figura 3<sup>74;75</sup>.

O gene da pré-elafina ou trapina 2 é composto de três éxons e dois íntrons e está localizado no cromossomo 20q 12-13. O gene *PI3* pertencente à família das trapinas (Trappin, TRansglutaminase substrate and wAP domain containing ProteIN, substrato de transglutaminase e proteína contendo o domínio WAP); o qual se refere a sua propriedade de ficar presa em um tecido e, por isso, funciona como uma proteína de ancoragem<sup>76;77</sup>. As trapinas são numeradas de acordo com a sua ordem de identificação e a pré-elafina ou trapina-2 foi, portanto, a segunda trapina a ser identificada<sup>61</sup>. Nos seres humanos, há cinco tipos diferentes de trapinas que foram identificadas, mas poucas informações se têm sobre a real atividade dessas proteínas<sup>64</sup>.



**Figura 3.** Estrutura da elafina - A trapina-2 é capaz de ligar os componentes da matriz extra-celular através do seu domínio cementoína; ao mesmo tempo o domínio elafina permite a inibição de proteases específicas. Após a ação da enzima triptase (a seta indica o local de clivagem), estes dois domínios são quebrados. Oito resíduos de cisteína estão envolvidos na formação das quatro pontes dissulfeto. Adaptado de Verrier *et al.*<sup>74</sup>

## Expressão e ativação da Elafina

A elafina inibe especificamente três serino-proteases: a elastase pancreática suína, proteinase 3 e elastase neutrofílica e apresenta atividade inibitória mais restrita que SLPI<sup>78</sup>. Nos últimos 20 anos, diferentes pesquisadores demonstraram a participação da elafina na atividade antimicrobiana, cicatrização de feridas, inflamação, apoptose e proliferação nos mais diversos tecidos de diferentes órgãos como pele (psoríase), pulmões (bronquites, doença pulmonar obstrutiva crônica), intestinos (colite), glândulas salivares (gingivite), trato vaginal (endometriose), placenta, membranas fetais<sup>65;74</sup>. A expressão da elafina na pele ocorre no epitélio escamoso (constantemente exposto a

18

estímulos inflamatórios), sugerindo que sua expressão seja induzida por trauma, irritação, citocinas pró-inflamatórias e atue posteriormente contribuindo para a proteção da pele contra agentes externos e contra elastase neutrofílica excessiva <sup>64;66</sup>.

Durante o processo inflamatório, foi observado que variações na expressão da elafina alteram o tempo de resposta do sistema imune por influência da secreção de citocinas <sup>79</sup>. A expressão aumentada da elafina foi associada à redução do tecido infartado, redução da perda de miócitos e preservação da função em diversos modelos de isquemia de reperfusão <sup>59</sup>.

No sistema reprodutor feminino, a expressão da elafina ocorre nos neutrófilos endometriais durante o ciclo menstrual, iniciando no final da fase secretora e atingindo o seu ápice no período menstrual. Sugere-se que a elafina participe no controle do processo inflamatório, onde o tecido endometrial necrótico e o sangue favorecem a proliferação bacteriana <sup>64;80;81</sup>.

## **Funções da Elafina**

Tanto a SLPI quanto a elafina apresentam atividade antimicrobiana “*in vivo*” e “*in vitro*”; a elafina, por exemplo, possui atividade contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Candida albicans* <sup>64;82;83</sup>. O mecanismo da atividade antimicrobiana desses inibidores ainda não é conhecido, mas pode ser explicado pela interação destes dois inibidores catiônicos com a membrana aniônica da bactéria, levando a sua desestabilização <sup>64;66;84;85</sup>. A expressão das trapinas é afetada pela da inflamação do hospedeiro, podendo influenciar o curso das doenças; foram observados níveis diminuídos da elafina no fluido gengival de indivíduos que sofrem de periodontite e de mulheres com vaginose bacteriana, quando comparados aos indivíduos saudáveis <sup>86;87</sup>.

A elafina demonstrou suprimir a inflamação em modelos de infarto do miocárdio, aterosclerose e miocardite viral <sup>59</sup>. No Reino Unido, um estudo com 80 pacientes está em andamento para investigar a atuação da elafina na proteção miocárdica em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização (Estudo EMPIRE, *Elafin Myocardial Protection from Ischaemia RepErfusion injury*, Eudra CT no. 2010-019527-58).

A ação antibacteriana da elafina é essencial para o sucesso da reprodução humana<sup>88;89</sup>. O comportamento do sistema de defesa está relacionado às diferentes fases do ciclo menstrual feminino e, por possuir um papel na reparação tecidual, a elafina no endométrio tem a sua expressão mais marcada durante a menstruação<sup>80;90;92</sup>. Os leucócitos, as células NK e os peptídeos tem diferentes concentrações no tecido endometrial de acordo com a fase do ciclo hormonal feminino <sup>81;93;94</sup>.

### **Elafina em diferentes tecidos e órgãos**

A elafina é expressa em diferentes tecidos, em especial nas mucosas, quase sempre relacionada à ação anti-inflamatória, mas que não estão relacionadas exclusivamente a ação antiprotease ou antibacteriana <sup>95;96</sup>. Nos pulmões está associada a processos inflamatórios crônicos, como a doença pulmonar obstrutiva crônica <sup>97</sup>. Na pele, está associada a processos como a psoríase <sup>32;98;99</sup>. Sabe-se que também é expressa nas glândulas submandibulares de adultos e fetos <sup>100</sup>. No trato gastrointestinal, está relacionada a processos inflamatórios crônicos como a Doença de Cronh <sup>101</sup>. Atualmente também está relacionada à pesquisa em transplantes e aos eventos de rejeição<sup>102</sup>. A próxima secção descreverá com maiores detalhes a elafina no trato genital feminino.

## **Elafina no Trato Genital Feminino**

Do ponto de vista anatômico e de esterilidade, pode-se dividir o aparelho reprodutivo feminino em três grandes áreas: a primeira (não-estéril), composta pela vagina e a ectocérvice; a segunda (estéril) composta pelo endométrio, tubas de Falópio e a terceira, a endocérvice, cuja esterilidade varia de acordo com alterações hormonais do ciclo menstrual<sup>1;103-106</sup>.

O epitélio estratificado da vagina, da ectocérvice e o muco secretado pelas células endocervicais (composto por água, íons, proteínas, imunoglobulinas, enzimas e lactoferrina) funcionam como uma importante barreira à entrada de agentes infecciosos e atuam como agentes bacteriostáticos<sup>107-111</sup>. Eggert-Kruse *et al.* demonstraram que o muco cervical, principalmente no período periovulatório, contém poderosa atividade antimicrobiana<sup>112;113</sup>.

Imunologicamente, o aparelho reprodutor feminino apresenta tolerância ao espermatozoide e ao feto, e atua contra microorganismos e mantém a homeostasia<sup>114;115</sup>. A mucosa do trato genital apresenta muitas características imunológicas distintas e não comparáveis a outros tecidos. O trato genital feminino compreende um sistema imune independente do sistema imune sistêmico, uma vez que os linfócitos ativados em um local da mucosa se dispersam e migram para outras mucosas<sup>116</sup>. As células epiteliais são capazes de produzir substâncias com ação antimicrobiana como elafina, SLPI e defensinas<sup>5;117</sup>.

A classe de imunoglobulinas secretadas é principalmente IgG e não IgA e a resposta imune é muito influenciada pelas alterações hormonais, o que não é observado em outros sítios<sup>118;119</sup>. A resposta imune inata do trato genital inferior, o qual inclui o próprio epitélio de barreira, a presença de muco, o pH ácido em torno de 4,5, envolve

células (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células NK) e fatores solúveis (defensinas, óxido nítrico, componentes do complemento entre outros) e, apesar não ser específica, representa a primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos <sup>2</sup>. Existem evidências de que o sistema imune das mucosas se comportaria de forma “sítio-específica”, ou seja, a resposta poderia ser diferente dependendo do local. Essa hipótese também é demonstrada por estudos utilizando o modelo da *Chlamydia trachomatis*, o que indica um padrão diferente de resposta de linfócitos T no trato genital superior e inferior durante a infecção <sup>120</sup>. Infecções como as causadas por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* podem provocar complicações como a doença inflamatória pélvica, a qual, por sua vez, pode levar a um quadro irreversível de infertilidade <sup>121;122</sup>.

A Elafina é expressa na vagina e cérvix, porém não é expressa no muco cervical <sup>123</sup>. A expressão da elafina no trato genital feminino pode ser resumida conforme dados da Tabela 3.

**Tabela 3** : Expressão da Elafina nos tecidos do Trato Genital Feminino

Sítio de Expressão	Método de identificação da Elafina	Referência
Trompa de Falópio não grávida	RNAm e Proteína	124
Endométrio	RNAm elevado no ciclo menstrual	90
Endométrio (hidrossalpinge)	Proteína	125
Cérvix	Proteína	123
Vagina	RNAm e Proteína	126; 123
Amnion	RNAm e Proteína	127;128
Corion	RNAm e Proteína	128
Placenta	RNAm e Proteína	128
Decídua	RNAm e Proteína	128
Secreção vaginal	RNAm e Proteína	87

RNAm: RNA mensageiro

## **Elafina e o ciclo menstrual**

O ciclo menstrual caracteriza-se por promover respostas celulares no trato genital feminino, especificamente no endométrio, vinculados ao estímulo hormonal provocado basicamente pela ação de hormônios secretados pelos ovários (estrogênio e progesterona) <sup>129-131</sup>.

Do ponto de vista celular e molecular, durante esse período, as células endometriais passam por fenômenos marcantes, tais como significativo aumento na apoptose, desarranjos na expressão de moléculas de adesão, perdas dos filamentos de actina das bordas celulares e consequente fragmentação das glândulas endometriais <sup>132-136</sup>.

O sistema de defesa atua em todas fases do ciclo menstrual feminino, leucócitos, células NK e peptídeos sofrem e apresentam diferentes concentrações no tecido endometrial de acordo com a resposta ao ciclo hormonal feminino <sup>123;137;138</sup>. A elafina atua na reparação tecidual; sua maior concentração foi observada no final do ciclo secretor e principalmente no período menstrual do ciclo feminino <sup>137</sup>.

A influência da progesterona torna os canais interepiteliais mais frouxos durante a ovulação e a fase lútea do ciclo, permitindo a passagem de substâncias e células para o lúmen vaginal e vice-versa <sup>104;139</sup>. A progesterona contribui diretamente na regulação dos inibidores de leucoproteases secretores no trato genital feminino independente da presença de agentes inflamatórios; existe uma relação entre os inibidores de leucoproteases secretores, em especial a elafina e a produção de progesterona durante o ciclo menstrual. <sup>80;104</sup>

O endométrio é constituído por mucosa formada por duas camadas distintas, a basal e a funcional; o endométrio é composto de diferentes tipos celulares, incluindo as células

epiteliais glandulares e estromais, os fibroblastos e as células linfoides, entre outras <sup>140</sup>. As alterações do endométrio no ciclo menstrual são observadas nestes diferentes tipos celulares, sendo controlada, principalmente, pelos hormônios esteroides <sup>129;141</sup>. O sangramento, por sua vez, decorre do comprometimento da integridade dos vasos sanguíneos e da dissolução da matriz extracelular <sup>130</sup>. Todo esse processo é regido tanto por mecanismos locais quanto sistêmicos; os elementos parácrinos e/ou autócrinos são responsáveis por esses efeitos <sup>81;141</sup>.

A presença da elafina no tecido uterino está relacionada à ação dos neutrófilos localizados no estroma endometrial sinalizando o processo inflamatório controlado através da ação anti-protease justamente no final do período secretor do ciclo menstrual e durante a menstruação, quando existem alterações ambientais importantes com a presença de tecido endometrial necrótico e sangue, elementos catalisadores da reprodução e proliferação bacterianas <sup>80;90;142</sup>. A quantidade de imunoglobulinas presentes nas secreções cervicovaginais é regulada por hormônios, portanto varia durante o ciclo menstrual, com uma acentuada diminuição nos níveis durante o período da ovulação. Os níveis de IgA e IgG diminuem durante a fase folicular, atingem uma quantidade mínima durante o período de ovulação e aumentam durante a fase lútea <sup>143</sup>.

Simultaneamente, além do comportamento de proteção, esse sistema deve permitir, paralelamente, todo o processo de fecundação. A migração dos espermatozoides deve ser facilitada, minimizando os efeitos da reação tipo corpo estranho <sup>118;122</sup>.

### **A Elafina no pós-parto**

No momento do pós- parto, e a resolução do puerpério, uma extensa atividade inflamatória é desencadeada como mecanismo reacional à abertura do leito placentário.

As proteases são então liberadas neste microambiente. Nesse momento, enzimas da família das trapinas, como as elafinas são liberadas e atuam como limitadores da ação das elastases no processo inflamatório natural de cicatrização do leito placentário. Simultaneamente no ambiente local atua como agente bactericida natural <sup>128</sup>. Percebe-se, portanto, que a elafina é um peptídeo relevante nos processos que envolvem o trato genital feminino.

### **Uso clínico da elafina recombinante**

Devido a grande capacidade de inibição de proteases, a elafina está atraindo a atenção dos laboratórios farmacêuticos e parece ser uma droga promissora para o tratamento de doenças pulmonares inflamatórias e lesões severas por reperfusão. A elafina recombinante administrada por via intravenosa demonstrou excelente tolerabilidade em estudo fase I. Os resultados do estudo fase II para o tratamento de reações inflamatórias no pós-operatório de carcinoma de esôfago, foram animadores; 63% dos pacientes que receberam elafina intravenosa necessitaram de apenas 1 dia na área de recuperação intensiva, enquanto pacientes tratados com placebo permaneceram por mais tempo. Os resultados do estudo EMPIRE (Elafin Myocardial Protection from Ischaemia Reperfusion Injury) duplo cego, controlado por placebo, fase II para avaliar a eficácia da elafina na prevenção de complicações após cirurgia coronária ainda estão para serem publicados em breve.

Em janeiro de 2013, a FDA (Food and Drug Administration) concedeu à elafina a classificação de “medicamento órfão” para o tratamento de hipertensão arterial pulmonar nos países da que pertencem aos Estados Unidos e União Européia <sup>144</sup>.

## ***Gravidez ectópica***

A implantação e desenvolvimento do embrião fora da cavidade corporal do útero é denominada gravidez ectópica (GE) <sup>145;146</sup>. No Brasil, a mortalidade por gestação ectópica insere-se entre as causas hemorrágicas, porém não existem dados sobre a prevalência nacionais da GE <sup>147</sup>. Na emergência do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a prevalência de casos de gravidez ectópica no ano de 2012 foi de 16% de todas as gestantes atendidas (dados obtidos junto ao projeto 11-0113 que ainda está em andamento). A gravidez tubária permanece a causa mais comum de mortalidade materna no primeiro trimestre de gestação <sup>7;148;149</sup>.

Em países desenvolvidos, a GE é classificada como problema de Saúde Pública com aumento de incidência e a prevalência a partir de 2009 <sup>7</sup>. O aumento da incidência nos últimos anos tem sido atribuído ao crescimento de alguns fatores de risco, dentre os principais destacam-se (a) aumento do número de casos de salpingite secundária *Chlamydia trachomatis* ou a outras doenças sexualmente transmissíveis, (b) aprimoramento dos métodos propedêuticos, possibilitando o diagnóstico de GE em regressão espontânea, despercebido no passado <sup>5;87;124;150;151</sup>.

## **Fatores de risco para a Gravidez Ectópica**

A lesão tubária, anatômica ou funcional, é a principal etiologia da gravidez ectópica <sup>148</sup>. Qualquer fator que impeça, ou retarde a passagem do ovo fertilizado para dentro da cavidade uterina aumenta sua chance de ocorrência; 50% das pacientes com GE não apresenta qualquer sintoma no momento do exame <sup>9;145;146</sup>. Vários podem ser os fatores envolvidos nesta intercorrência, como algum problema mecânico ou alterações funcionais. Dentre os fatores de risco mecânicos encontram-se:

Salpingite ou Doença Inflamatória Pelvica crônica (tem aumentado sua importância devido ao aumento da incidência de infecção por clamídia e gonococos);

Gravidez ectópica prévia (promove uma recorrência de 10% após o primeiro episódio, e de até 25% após dois ou mais, dependendo do tratamento adotado);

Cirurgia tubária prévia (relacionada diretamente a patologia tubária que a indicou);

Abortos provocados, cesárea anterior e técnicas de reprodução assistida, como indução da ovulação, transferência de gametas na trompa e fertilização “in vitro” com transferência de embriões <sup>3;4;9;11;87;146;152;153</sup>.

Dentre os fatores funcionais, podemos citar a migração externa do ovo, refluxo menstrual, motilidade tubária alterada e tabagismo na época da concepção (tabagismo promove a diminuição da imunidade e da motilidade tubária, sendo sua influência dose-dependente), Idade (a incidência de gravidez ectópica aumenta com a idade, devido ao tempo de exposição da paciente aos fatores de risco, chegando a 4,0% após os 35 anos) <sup>3;4;9;11;87;146;153</sup>.

### **Localização da gravidez ectópica**

A tuba uterina é uma estrutura anatômica, bilateral, de 10 a 12cm de comprimento, podendo ser subdividida em quatro segmentos de limites imprecisos: infundíbulo, ampola, istmo e porção intersticial <sup>145;146</sup>. O segmento mais lateral, infundíbulo contém fimbrias na sua extremidade, cuja principal função é a captura do óvulo na cavidade peritoneal. A região ampular, segmento medial ao infundíbulo, é a porção mais longa, onde, na maioria das vezes, ocorre a fertilização do óvulo <sup>145</sup>.

A grande maioria das gravidezes ectópicas é localizada nas tubas uterinas (98%), assim distribuídas: ampola (80%), istmo (12%), fimbrias (6%), interstício (2%). Outras localizações (ovários, cavidade abdominal e colo) são raras, no entanto suas incidências têm sofrido uma elevação devida às técnicas de reprodução assistida, o que tem elevado também os achados de gestações heterotópicas, definidas como a presença de uma gestação tópica associada a uma gestação ectópica <sup>148;154</sup>.

## **Fisiologia**

### **Transporte do embrião**

Transporte do embrião através da trompa de Falópio é controlado pela contração do músculo liso e batimentos ciliares, que por sua vez são regulados pelos hormônios sexuais e Interleucina-6. A contração muscular produz movimentos oscilantes no istmo do tubo que podem modular a velocidade do transporte através trompa <sup>155</sup>. Os hormônios sexuais e outros fatores produzidos pelo óvulo em si, como prostaglandinas, óxido nítrico, prostaciclina também podem modular a contração muscular e desempenhar um papel de no transporte de embrião <sup>156-158</sup>.

Embora a importância do papel de cada um destes mecanismos ainda não esteja clara, existem evidências de que o movimento ciliar desempenha uma função importante no movimento do embrião. Casos de GE em trompas apresentam uma redução significativa do número de células ciliadas em comparação com uma gravidez intra-uterina do mesmo estágio gestacional <sup>155</sup>.

## **Elafina, tuba uterina e gravidez ectópica**

Os inibidores da protease têm importante ação durante a janela de implantação do óvulo por prevenir uma resposta inflamatória excessiva do útero no momento da implantação do óvulo e durante o início da gravidez <sup>159</sup>. A elafina é constantemente expressa nas tubas de Falópio durante o ciclo menstrual <sup>90</sup>. Os níveis de RNAm da elafina estão elevados nos casos de gravidez ectópica e, na presença de infecção aguda por clamídia<sup>124</sup>. Esses achados sugerem que a elafina esteja envolvida no sistema de proteção imune das tubas uterinas durante o ciclo menstrual normal e em condições patológicas como infecção e implantação ectópica e no processo inflamatório que ocorre na gestação ectópica.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Quayle AJ: The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells *J Reprod Immunol* 2002;57:61-79.
2. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L: Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev* 2005;206:306-335.
3. Taylor BD, Darville T, Haggerty CL: Does bacterial vaginosis cause pelvic inflammatory disease? *Sex Transm Dis* 2013;40:117-122.
4. Mylonas I: Female genital Chlamydia trachomatis infection: where are we heading? *Arch Gynecol Obstet* 2012;285:1271-1285.
5. Horne AW, Stock SJ, King AE: Innate immunity and disorders of the female reproductive tract *Reproduction* 2008;135:739-749.
6. Hiemstra PS: Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation *Biochem Soc Trans* 2002;30:116-120.
7. Ectopic pregnancy mortality - Florida, 2009-2010 *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2012;61:106-109.
8. Shaw JL, Dey SK, Critchley HO, Horne AW: Current knowledge of the aetiology of human tubal ectopic pregnancy. *Hum Reprod Update* 2010;16:432-444.
9. Horne AW, Critchley HO: Mechanisms of disease: the endocrinology of ectopic pregnancy *Expert Rev Mol Med* 2012;14:e7.

10. Shao R, Feng Y, Zou S, Weijdegard B, Wu G, Brannstrom M, Billig H: The role of estrogen in the pathophysiology of tubal ectopic pregnancy *Am J Transl Res* 2012;4:269-278.
11. Barnhart, K. T. T., Sammel, M. D., Gracia, C. R., Chittams, J., Hummel, A. C., and Shaunik, A. Risk factors for ectopic pregnancy in women with symptomatic first-trimester pregnancies. *Fertil Steril* 86(1), 36-43. 1-7-2006.
12. Rabiou KA, Adewunmi AA, Akinlusi FM, Akinola OI: Female reproductive tract infections: understandings and care seeking behaviour among women of reproductive age in Lagos, Nigeria. *BMC Womens Health* 2010;10:8.
13. Liaskou E, Wilson DV, Oo YH: Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators Inflamm* 2012;2012:949157.
14. Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP: Disease tolerance as a defense strategy. *Science* 2012;335:936-941.
15. Guyton AC, Hall JE: Resistance of the body to infection: I. Leukocytes, granulocytes, the monocyte-macrophage system, and inflammation. *In Textbook of Medical Physiology*, Philadelphia W.B. Saunders 1996, 1996, pp 405-419.
16. Delves PJ, Roitt IM: The immune system. First of two parts *N Engl J Med* 2000;343:37-49.
17. Medzhitov R, Janeway C, Jr.: Innate immunity. *N Engl J Med* 2000;343:338-344.
18. Male D: *Immunology*. Netherlands, Elsevier, 2006.
19. Abbas AK, Lichtman AH: *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2009. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2009.

20. Mayer, D. and Nyland, J. Cells involved in immune responses and antigen recognition. Immunology. <http://pathmicro.med.sc.edu/bowers/immune%20cells.htm>. 2010.
21. Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM: Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:125-163.
22. Delves PJ, Roitt IM: The immune system. Second of two parts *N Engl J Med* 2000;343:108-117.
23. Sheldon IM, Bromfield JJ: Innate immunity in the human endometrium and ovary *Am J Reprod Immunol* 2011;66 Suppl 1:63-71.
24. Kumar H, Kawai T, Akira S: Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011;30:16-34.
25. Ishida-Yamamoto A, Iizuka H: Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders *Exp Dermatol* 1998;7:1-10.
26. Mogensen TH: Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses *Clin Microbiol Rev* 2009;22:240-73, Table.
27. Wanke I, Steffen H, Christ C, Krismer B, Gotz F, Peschel A, Schaller M, Schittek B: Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways. *J Invest Dermatol* 2011;131:382-390.
28. Kawai T, Akira S: Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity *Immunity* 2011;34:637-650.
29. Tosi MF: Innate immune responses to infection *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:241-249.

30. Gallo RL, Nakatsuji T: Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin *J Invest Dermatol* 2011;131:1974-1980.
31. Faust K, Sathirapongsasuti JF, Izard J, Segata N, Gevers D, Raes J, Huttenhower C: Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS Comput Biol* 2012;8:e1002606.
32. Tanaka N, Fujioka A, Tajima S, Ishibashi A, Hirose S: Elafin is induced in epidermis in skin disorders with dermal neutrophilic infiltration: interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha stimulate its secretion in vitro *Br J Dermatol* 2000;143:728-732.
33. Underhill DM, Ozinsky A: Toll-like receptors: key mediators of microbe detection *Curr Opin Immunol* 2002;14:103-110.
34. Pham CT: Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1317-1333.
35. Schmidt EP, Lee WL, Zemans RL, Yamashita C, Downey GP: On, around, and through: neutrophil-endothelial interactions in innate immunity *Physiology (Bethesda)* 2011;26:334-347.
36. Faurschou M, Sorensen OE, Johnsen AH, Askaa J, Borregaard N: Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties *Biochim Biophys Acta* 2002;1591:29-35.
37. Perera NC, Schilling O, Kittel H, Back W, Kremmer E, Jenne DE: NSP4, an elastase-related protease in human neutrophils with arginine specificity *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:6229-6234.

38. Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F: Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases *Pharmacol Rev* 2010;62:726-759.
39. Kjeldsen L, Sengelov H, Lollike K, Nielsen MH, Borregaard N: Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils *Blood* 1994;83:1640-1649.
40. Zeeuwen PL: Epidermal differentiation: the role of proteases and their inhibitors. *Eur J Cell Biol* 2004;83:761-773.
41. Zani ML, Moreau T: Phage display as a powerful tool to engineer protease inhibitors. *Biochimie* 2010;92:1689-1704.
42. Almonte AG, Sweatt JD: Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: roles in synaptic function and behavior *Brain Res* 2011;1407:107-122.
43. Safavi F, Rostami A: Role of serine proteases in inflammation: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases *Exp Mol Pathol* 2012;93:428-433.
44. Suzuki T, Chow CW, Downey GP: Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1348-1361.
45. Gill SE, Parks WC: Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1334-1347.
46. Owen CA: Leukocyte cell surface proteinases: regulation of expression, functions, and mechanisms of surface localization. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1246-1272.

47. Henriksen PA, Sallenave JM: Human neutrophil elastase: mediator and therapeutic target in atherosclerosis *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1095-1100.
48. Lee WL, Downey GP: Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:896-904.
49. Wilkinson TS, Roghanian A, Simpson AJ, Sallenave JM: WAP domain proteins as modulators of mucosal immunity *Biochem Soc Trans* 2011;39:1409-1415.
50. Sallenave JM, Si TM, Cox G, Chignard M, Gauldie J: Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils *J Leukoc Biol* 1997;61:695-702.
51. Sallenave JM: The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteinases in inflammatory lung disease *Respir Res* 2000;1:87-92.
52. Araki K, Kuroki J, Ito O, Kuwada M, Tachibana S: Novel peptide inhibitor (SPAI) of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase from porcine intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;164:496-502.
53. Thompson RC, Ohlsson K: Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:6692-6696.
54. Wiedow O, Schroder JM, Gregory H, Young JA, Christophers E: Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1990;265:14791-14795.

55. Schalkwijk J, CHANG A, JANSSEN P, de Jongh GJ, MIER PD: Skin-derived antileucoproteases (SKALPs): characterization of two new elastase inhibitors from psoriatic epidermis. *Br J Dermatol* 1990;122:631-641.
56. Schalkwijk J, de RC, de Jongh GJ: Skin-derived antileukoproteinase (SKALP), an elastase inhibitor from human keratinocytes. Purification and biochemical properties *Biochim Biophys Acta* 1991;1096:148-154.
57. Hochstrasser K, Albrecht GJ, Schonberger OL, Rasche B, Lempart K: An elastase-specific inhibitor from human bronchial mucus. Isolation and characterization *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1981;362:1369-1375.
58. Kramps JA, Klasen EC: Characterization of a low molecular weight anti-elastase isolated from human bronchial secretion *Exp Lung Res* 1985;9:151-165.
59. Alam SR, Newby DE, Henriksen PA: Role of the endogenous elastase inhibitor, elafin, in cardiovascular injury: from epithelium to endothelium *Biochem Pharmacol* 2012;83:695-704.
60. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ: Evolutionary families of peptidase inhibitors *Biochem J* 2004;378:705-716.
61. Schalkwijk J, Wiedow O, Hirose S: The trappin gene family: proteins defined by an N-terminal transglutaminase substrate domain and a C-terminal four-disulphide core. *Biochem J* 1999;340 ( Pt 3):569-577.
62. Sevier CS, Kaiser CA: Formation and transfer of disulphide bonds in living cells *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:836-847.
63. Bulaj G: Formation of disulfide bonds in proteins and peptides *Biotechnol Adv* 2005;23:87-92.

64. Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM: SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci (Lond)* 2006;110:21-35.
65. Scott A, Weldon S, Taggart CC: SLPI and elafin: multifunctional antiproteases of the WFDC family *Biochem Soc Trans* 2011;39:1437-1440.
66. Moreau T, Baranger K, Dade S, let-Choisy S, Guyot N, Zani ML: Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family *Biochimie* 2008;90:284-295.
67. Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F: Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie* 2008;90:227-242.
68. Wiedow O, Luademann J, Utecht B: Elafin is a potent inhibitor of proteinase 3 *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:6-10.
69. Kuijpers AL, Schalkwijk J, Rulo HF, Peperkamp JJ, van de Kerkhof PC, de Jong EM: Extremely low levels of epidermal skin-derived antileucoprotease/elafin in a patient with impetigo herpetiformis *Br J Dermatol* 1997;137:123-129.
70. Idoji Y, Watanabe Y, Yamashita A, Yamanishi K, Nishiguchi S, Shimada K, Yasunaga T, Yamanishi H: In silico study of whey-acidic-protein domain containing oral protease inhibitors *Int J Mol Med* 2008;21:461-468.
71. Koizumi M, Fujino A, Fukushima K, Kamimura T, Takimoto-Kamimura M: Complex of human neutrophil elastase with 1/2SLPI *J Synchrotron Radiat* 2008;15:308-311.
72. Kuroki J, Hosoya T, Itakura M, Hirose S, Tamechika I, Yoshimoto T, Ghoneim MA, Nara K, Kato A, Suzuki Y, Furukawa M, Tachibana S: Cloning, characterization,

and tissue distribution of porcine SPAI, a protein with a transglutaminase substrate domain and the WAP motif *J Biol Chem* 1995;270:22428-22433.

73. Zeeuwen PL, Hendriks W, de Jong WW, Schalkwijk J: Identification and sequence analysis of two new members of the SKALP/elafin and SPAI-2 gene family. Biochemical properties of the transglutaminase substrate motif and suggestions for a new nomenclature *J Biol Chem* 1997;272:20471-20478.

74. Verrier T, Solhonne B, Sallenave JM, Garcia-Verdugo I: The WAP protein Trappin-2/Elafin: a handyman in the regulation of inflammatory and immune responses *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:1377-1380.

75. Guyot N, Zani ML, Berger P, let-Choisy S, Moreau T: Proteolytic susceptibility of the serine protease inhibitor trappin-2 (pre-elafin): evidence for tryptase-mediated generation of elafin *Biol Chem* 2005;386:391-399.

76. Kato A, Rooney AP, Furutani Y, Hirose S: Evolution of trappin genes in mammals *BMC Evol Biol* 2010;10:31.

77. Clauss A, Lilja H, Lundwall A: A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein *Biochem J* 2002;368:233-242.

78. Tsunemi M, Matsuura Y, Sakakibara S, Katsube Y: Crystal structure of an elastase-specific inhibitor elafin complexed with porcine pancreatic elastase determined at 1.9 Å resolution *Biochemistry* 1996;35:11570-11576.

79. McMichael JW, Roghanian A, Jiang L, Ramage R, Sallenave JM: The antimicrobial antiproteinase elafin binds to lipopolysaccharide and modulates macrophage responses. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:443-452.

80. King AE, Critchley HO, Kelly RW: Innate immune defences in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:116.
81. Henriot P, Gaide Chevonnay HP, Marbaix E: The endocrine and paracrine control of menstruation *Mol Cell Endocrinol* 2012;358:197-207.
82. Baranger K, Zani ML, Chandenier J, let-Choisy S, Moreau T: The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (pre-elafin) do not depend on its protease inhibitory function *FEBS J* 2008;275:2008-2020.
83. Wilkinson TS, Dhaliwal K, Hamilton TW, Lipka AF, Farrell L, Davidson DJ, Duffin R, Morris AC, Haslett C, Govan JR, Gregory CD, Sallenave JM, Simpson AJ: Trappin-2 promotes early clearance of *Pseudomonas aeruginosa* through CD14-dependent macrophage activation and neutrophil recruitment *Am J Pathol* 2009;174:1338-1346.
84. Bellemare A, Vernoux N, Morin S, Gagne SM, Bourbonnais Y: Structural and antimicrobial properties of human pre-elafin/trappin-2 and derived peptides against *Pseudomonas aeruginosa* *BMC Microbiol* 2010;10:253.
85. Bellemare A, Vernoux N, Morisset D, Bourbonnais Y: Human pre-elafin inhibits a *Pseudomonas aeruginosa*-secreted peptidase and prevents its proliferation in complex media *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:483-490.
86. Kretschmar S, Yin L, Roberts F, London R, Flemmig TT, Arushanov D, Kaiyala K, Chung WO: Protease inhibitor levels in periodontal health and disease *J Periodontal Res* 2012;47:228-235.
87. Stock SJ, Duthie L, Tremaine T, Calder AA, Kelly RW, Riley SC: Elafin (SKALP/Trappin-2/proteinase inhibitor-3) is produced by the cervix in pregnancy and

cervicovaginal levels are diminished in bacterial vaginosis. *Reprod Sci* 2009;16:1125-1134.

88. Fitch PM, Roghanian A, Howie SE, Sallenave JM: Human neutrophil elastase inhibitors in innate and adaptive immunity *Biochem Soc Trans* 2006;34:279-282.

89. Sallenave JM: Antimicrobial activity of antiproteinases *Biochem Soc Trans* 2002;30:111-115.

90. King AE, Critchley HO, Sallenave JM, Kelly RW: Elafin in human endometrium: an antiprotease and antimicrobial molecule expressed during menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4426-4431.

91. Kyongo JK, Jespers V, Goovaerts O, Michiels J, Menten J, Fichorova RN, Crucitti T, Vanham G, Arien KK: Searching for lower female genital tract soluble and cellular biomarkers: defining levels and predictors in a cohort of healthy Caucasian women *PLoS One* 2012;7:e43951.

92. Salamonsen LA, Woolley DE: Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells *J Reprod Immunol* 1999;44:1-27.

93. Chen B, Wen Y, Zhang Z, Guo Y, Warrington JA, Polan ML: Microarray analysis of differentially expressed genes in vaginal tissues from women with stress urinary incontinence compared with asymptomatic women *Hum Reprod* 2006;21:22-29.

94. Maybin JA, Critchley HO, Jabbour HN: Inflammatory pathways in endometrial disorders *Mol Cell Endocrinol* 2011;335:42-51.

95. Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH: Antibacterial activity of antileukoprotease *Infect Immun* 1996;64:4520-4524.

96. Simpson AJ, Maxwell AI, Govan JR, Haslett C, Sallenave JM: Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens *FEBS Lett* 1999;452:309-313.
97. Griese M, Pudenz P, Gebhard W: Inhibitors of elastase in airway lavage samples from ventilated preterm human neonates *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:256-262.
98. Wiedow O, Ludemann J, Utecht B, Christophers E: Inhibition of proteinase 3 activity by peptides derived from human epidermis *Adv Exp Med Biol* 1993;336:61-64.
99. Tanaka N, Fujioka A, Tajima S, Ishibashi A, Hirose S: Levels of proelafin peptides in the sera of the patients with generalized pustular psoriasis and pustulosis palmoplantaris *Acta Derm Venereol* 2000;80:102-105.
100. Lee SK, Lee SS, Hirose S, Park SC, Chi JG, Chung SI, Mori M: Elafin expression in human fetal and adult submandibular glands *Histochem Cell Biol* 2002;117:423-430.
101. Schmid M, Fellermann K, Fritz P, Wiedow O, Stange EF, Wehkamp J: Attenuated induction of epithelial and leukocyte serine antiproteases elafin and secretory leukocyte protease inhibitor in Crohn's disease *J Leukoc Biol* 2007;81:907-915.
102. Cowan B, Baron O, Crack J, Coulber C, Wilson GJ, Rabinovitch M: Elafin, a serine elastase inhibitor, attenuates post-cardiac transplant coronary arteriopathy and reduces myocardial necrosis in rabbits after heterotopic cardiac transplantation *J Clin Invest* 1996;97:2452-2468.

103. Pioli PA, Amiel E, Schaefer TM, Connolly JE, Wira CR, Guyre PM: Differential expression of Toll-like receptors 2 and 4 in tissues of the human female reproductive tract *Infect Immun* 2004;72:5799-5806.
104. Patel MV, Fahey JV, Rossoll RM, Wira CR: Innate Immunity in the Vagina (Part I): Estradiol Inhibits HBD2 and Elafin Secretion by Human Vaginal Epithelial Cells *Am J Reprod Immunol* 2013.
105. Patton DL, Thwin SS, Meier A, Hooton TM, Stapleton AE, Eschenbach DA: Epithelial cell layer thickness and immune cell populations in the normal human vagina at different stages of the menstrual cycle . *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:967-973.
106. Gipson IK: Mucins of the human endocervix *Front Biosci* 2001;6:D1245-D1255.
107. Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA, Wang YM, Brabec C, Yip KP, Mok SC: Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* 1998;152:1247-1258.
108. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB, Ganz T: Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 1998;101:1633-1642.
109. Blaskewicz CD, Pudney J, Anderson DJ: Structure and function of intercellular junctions in human cervical and vaginal mucosal epithelia *Biol Reprod* 2011;85:97-104.
110. Fichorova RN, Anderson DJ: Differential expression of immunobiological mediators by immortalized human cervical and vaginal epithelial cells *Biol Reprod* 1999;60:508-514.
111. Hein M, Valore EV, Helmig RB, Uldbjerg N, Ganz T: Antimicrobial factors in the cervical mucus plug *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:137-144.

112. Cohen MS, Anderson DJ: Genitourinary mucosal defenses. *In* Sexually Transmitted Diseases, McGrawHill (ed). NY, 2013, pp 173-90.
113. Eggert-Kruse W, Botz I, Pohl S, Rohr G, Strowitzki T: Antimicrobial activity of human cervical mucus *Hum Reprod* 2000;15:778-784.
114. Tremellen KP, Seamark RF, Robertson SA: Seminal transforming growth factor beta1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus *Biol Reprod* 1998;58:1217-1225.
115. Schumacher GF, Kim MH, Hosseinian AH, Dupon C: Immunoglobulins, proteinase inhibitors, albumin, and lysozyme in human cervical mucus. I. Communication: hormonal profiles and cervical mucus changes--methods and results. *Am J Obstet Gynecol* 1977;129:629-636.
116. Mestecky J, Moldoveanu Z, Russell MW: Immunologic uniqueness of the genital tract: challenge for vaccine development. *Am J Reprod Immunol* 2005;53:208-214.
117. Lima, Y. A. R. and Alves, M. F. C. O sistema imune da mucosa do trato genital feminino e o impacto das doenças sexualmente transmissíveis. *Rev Patol Tropic* 37(4), 295-309. 2008.
118. Johansson M, Lycke NY: Immunology of the human genital tract. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:43-49.
119. Marks E, Tam MA, Lycke NY: The female lower genital tract is a privileged compartment with IL-10 producing dendritic cells and poor Th1 immunity following *Chlamydia trachomatis* infection. *PLoS Pathog* 2010;6:e1001179.

120. Kelly KA, Walker JC, Jameel SH, Gray HL, Rank RG: Differential regulation of CD4 lymphocyte recruitment between the upper and lower regions of the genital tract during *Chlamydia trachomatis* infection *Infect Immun* 2000;68:1519-1528.
121. Ness RB, Smith KJ, Chang CC, Schisterman EF, Bass DC: Prediction of pelvic inflammatory disease among young, single, sexually active women *Sex Transm Dis* 2006;33:137-142.
122. Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P: Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007;21:347-354.
123. Pfundt R, van RF, van Vlijmen-Willems IM, Alkemade HA, Zeeuwen PL, Jap PH, Dijkman H, Fransen J, Croes H, van Erp PE, Schalkwijk J: Constitutive and inducible expression of SKALP/elafin provides anti-elastase defense in human epithelia *J Clin Invest* 1996;98:1389-1399.
124. King AE, Wheelhouse N, Cameron S, McDonald SE, Lee KF, Entrican G, Critchley HO, Horne AW: Expression of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin in human fallopian tube and in an in-vitro model of *Chlamydia trachomatis* infection *Hum Reprod* 2009;24:679-686.
125. Guedes Neto EP, Edelweiss MI, de Moraes GS, Cristovam RA, Savaris RF: The influence of hydrosalpinx on endometrial elafin expression *Fertil Steril* 2011;95:2673-2675.
126. Narvekar N, Lakha F, Critchley HO, Glasier AF, Williams AR, Leminen R, Heikinheimo O, Kelly RW, Baird DT: Changes in vaginal morphology, steroid receptor and natural antimicrobial content following treatment with low-dose mifepristone *Contraception* 2007;75:271-280.

127. Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, Calder AA: Natural antimicrobial production by the amnion *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:255-256.
128. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR: Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes *Placenta* 2007;28:161-169.
129. DeMayo FJ, Zhao B, Takamoto N, Tsai SY: Mechanisms of action of estrogen and progesterone *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:48-59.
130. Ribeiro EB: Sistema Reprodutor Feminino. *In Fisiologia Endócrina*, Manole (ed). 2012.
131. Messinis IE: From Menarche to Regular Menstruation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1092:49-56.
132. Tabibzadeh S, Kong QF, Satyaswaroop PG, Babaknia A: Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle *Hum Reprod* 1996;11:633-640.
133. Tabibzadeh S: Role of EBAF/Lefty in implantation and uterine bleeding *Ernst Schering Res Found Workshop* 2005;159-189.
134. Depalo R, Nappi L, Loverro G, Bettocchi S, Caruso ML, Valentini AM, Selvaggi L: Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles *Hum Reprod* 2003;18:2678-2682.
135. Amsterdam A, Sasson R, Keren-Tal I, Aharoni D, Dantes A, Rimon E, Land A, Cohen T, Dor Y, Hirsh L: Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life *Biochem Pharmacol* 2003;66:1355-1362.

136. Vaskivuo TE, Tapanainen JS: Apoptosis in the human ovary *Reprod Biomed Online* 2003;6:24-35.
137. Salamonsen LA, Lathbury LJ: Endometrial leukocytes and menstruation *Hum Reprod Update* 2000;6:16-27.
138. Aflatoonian R, Fazeli A: Toll-like receptors in female reproductive tract and their menstrual cycle dependent expression *J Reprod Immunol* 2008;77:7-13.
139. Zalányi S: Progesterone and ovulation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2001;98:152-159.
140. Kably A, Barroso G: Introduction to anatomy and physiology of human conception. *Reproductive BioMedicine Online* 2000;1:109-121.
141. Chabbert BN, Djakoure C, Maitre SC, Bouchard P: Regulation of the human menstrual cycle *Front Neuroendocrinol* 1998;19:151-186.
142. Li Q, Zhou XD, Xu XY, Yang J: Recombinant human elafin protects airway epithelium integrity during inflammation *Mol Biol Rep* 2010;37:2981-2988.
143. Beagley KW, Gockel CM: Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;38:13-22.
144. Scott CJ, Taggart CC: Biologic protease inhibitors as novel therapeutic agents. *Biochimie* 2010;92:1681-1688.
145. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ, Spong CY: Ectopic Pregnancy. *In Williams Obstetrics*, McGraw-Hill Education, 2009.

146. Stock RJ: Tubal pregnancy. Associated histopathology *Obstet Gynecol Clin North Am* 1991;18:73-94.
147. Moretti TBC, Olivotti BR, Fernandes AMS: Aspectos epidemiológicos e clínicos das gestações ectópicas em serviço universitário no período de 2000 a 2004. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2007;53:213-216.
148. Marion LL, Meeks GR: Ectopic pregnancy: History, incidence, epidemiology, and risk factors *Clin Obstet Gynecol* 2012;55:376-386.
149. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PF: WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review *Lancet* 2006;367:1066-1074.
150. den Hartog JE, Morre SA, Land JA: Chlamydia trachomatis-associated tubal factor subfertility: Immunogenetic aspects and serological screening *Hum Reprod Update* 2006;12:719-730.
151. Shaw JL, Horne AW: The paracrinology of tubal ectopic pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* 2012;358:216-222.
152. Jia-rong Z, Shuang-di L, Xiao-ping W: Eutopic or ectopic pregnancy: a competition between signals derived from the endometrium and the fallopian tube for blastocyst implantation. *Placenta* 2009;30:835-839.
153. Witkin SS: Immunological aspects of genital chlamydia infections. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;16:865-874.
154. Badr S, Ghareep AN, Abdulla LM, Hassanein R: Ectopic pregnancy in uncommon implantation sites. *The Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine* 2013;44:121-130.

155. Lyons RA, Saridogan E, Djahanbakhch O: The effect of ovarian follicular fluid and peritoneal fluid on Fallopian tube ciliary beat frequency *Hum Reprod* 2006;21:52-56.
156. Wanggren K, Stavreus-Evers A, Olsson C, Andersson E, Gemzell-Danielsson K: Regulation of muscular contractions in the human Fallopian tube through prostaglandins and progestagens *Hum Reprod* 2008;23:2359-2368.
157. Ekerhovd E, Brannstrom M, Alexandersson M, Norstrom A: Evidence for nitric oxide mediation of contractile activity in isolated strips of the human Fallopian tube *Hum Reprod* 1997;12:301-305.
158. Arbab F, Goldsby J, Matijevic-Aleksic N, Huang G, Ruan KH, Huang JC: Prostacyclin is an autocrine regulator in the contraction of oviductal smooth muscle *Hum Reprod* 2002;17:3053-3059.
159. King AE, Critchley HO, Kelly RW: Presence of secretory leukocyte protease inhibitor in human endometrium and first trimester decidua suggests an antibacterial protective role *Mol Hum Reprod* 2000;6:191-196.

## Justificativa

Apesar de estudos imuno-histoquímicos confirmarem a presença dos inibidores da protease em diferentes regiões do trato genital feminino, existem poucas informações sobre esse assunto. Numa busca realizada no PUBMED (Janeiro, 2013) sob os termos “ectopic pregnancy AND elafin”, foram encontrados 4 artigos sobre o assunto<sup>80;124;124;159</sup>, sendo que desses, 2 artigos são de revisão e os outros 2 artigos são experimentais. No trabalho de 2009, King *et al.*<sup>124</sup> apresentaram a expressão de RNAm de todo o tecido de gravidez ectópica com a tuba uterina e algumas fotos de imuno-histoquímica dos controles (fase folicular e luteal) e uma fotomicrografia de um caso de gravidez ectópica. O trabalho publicado não tem uma análise mais aprofundada sobre a expressão da elafina, não há quantificação da expressão da elafina por imuno-histoquímica, nem houve o cálculo do tamanho da amostra, apesar de terem utilizado 6 casos de gravidez ectópica. Os autores relatam que a expressão da elafina se mantém igual durante todo o ciclo menstrual em tubas normais, mas encontraram um aumento da expressão do RNAm da elafina nas tubas com gravidez. As fotos de imuno-histoquímica apresentadas na publicação se limitam a identificar a localização da proteína, porém, essa diferença não se percebe entre tubas normais e casos de gravidez ectópica.

A importância de explorar esse assunto está relacionada com a etiologia da gravidez ectópica. Se a alteração da elafina preceder o evento da gravidez ectópica, será possível realizar um tratamento profilático com o uso da elafina. Igualmente, nos casos de tratamento de gravidez ectópica, o uso da elafina intravenoso poderia ser utilizado como terapia co-adjuvante.

## **Objetivo**

Comparar a expressão da elafina nas tubas uterinas normais e com gravidez ectópica através da técnica de imuno-histoquímica.

## **Artigo em Inglês**

Title

Expression of Elafin in fallopian tubes of ectopic pregnancies

Running title

Elafin in ectopic pregnancy

Summary title

Reduced elafin in ectopic pregnancy

Key Words

Elafin / Fallopian tube / Ectopic pregnancy

Authors and affiliations

Melina GRUDZINSKI, PharmD, MSc <sup>1</sup>

Daniele G. FUHRICH, BSs <sup>2</sup>

Ricardo Francalacci SAVARIS, MD, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas - Univ. Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Ginecologia e Obstetrícia -Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Grant Support

This work was supported by Fundação de Incentivo a Pesquisa e Ensino (FIPE) – Hospital de Clínicas de Porto Alegre – grant 13-0107

Correspondence

Ricardo F Savaris

Serviço de Ginecologia e Obstetrícia - HCPA

Rua Ramiro Barcelos, 2350/1125, Porto Alegre, RS, 90035-903

Tel/Fax: 55 51 33598117

E-mail: [rsavaris@hcpa.ufrgs.br](mailto:rsavaris@hcpa.ufrgs.br)

## **ABSTRACT**

**Objective:** To compare the elafin expression in Fallopian tubes of normal and ectopic pregnancies.

**Study design:** Case-control study. Immunohistochemical analysis was performed on tissue sections of ectopic pregnancies (n=10) and normal tubes (n=10) from paraffin embedded blocks, obtained from subjects with confirmed ectopic pregnancy (case) and who underwent salpingectomy for benign conditions (control). Main outcome measure was the intensity of the staining with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) using ImageJ software. Statistical analysis was performed using Unpaired t-test.

**Conclusion:** The expression of elafin is reduced in tubal epithelium of ectopic pregnancies, compared to non ectopic pregnancy tubes.

## INTRODUCTION

Elafin is a serine protease inhibitor, also known as Elastase Specific Inhibitor, Trappin-2 or skin-derived antileukoprotease <sup>1;2</sup>. This protein has a low molecular weight and it belongs to the family of whey acidic protein (WAP) proteins <sup>3</sup>. This secreted protein is produced by epithelial cells and cells of the immune system <sup>4</sup>. Elafin has been shown to inhibit neutrophil elastase and has an antimicrobial action <sup>5</sup>. In endometrium, the expression of elafin occurs only during menses <sup>6</sup>; however, in mucosal of Fallopian tubes, its expression is constant over the menstrual cycle <sup>7</sup>.

Recently, our group published a study showing that women with hydrosalpinx had a reduced expression of elafin in endometrium <sup>8</sup>. This finding is the opposite of those found in chronic conditions, such as psoriasis, where elafin expression is up-regulated <sup>9</sup>.

Ectopic pregnancy is a condition that affects 1-2% of all pregnancies <sup>10</sup>. Tubal damage due to previous infection has been shown to be a risk factor for tubal pregnancy <sup>11</sup>.

The current literature evaluating the relationship between elafin and ectopic pregnancy is scant. After a PUBMED search (Pubmed search: ectopic pregnancy AND elafin, no limits, from 1966 until January 2013, search performed on January 04<sup>th</sup>, 2013), only 4 articles were identified <sup>7;12-14</sup>. From these, two were review articles <sup>13;14</sup>. King et al. using 6 cases of tubal pregnancy demonstrated that mRNA and protein expression of elafin is up-regulated <sup>7</sup>. However their data have few limitations. mRNA analysis was made in whole tissue of ectopic pregnancy, and since this condition has an infiltrate of leukocytes, it may give a false up-regulated result. In addition, the authors did not present full data on immunohistochemical expression of elafin. Only one picture of immune staining was presented. In contrast, it seems that the oviduct at risk for ectopic

pregnancy would have a chronic condition, rather an acute infection, and according to our results, protein expression of elafin would be diminished<sup>8</sup>. Therefore, it is plausible to expect that elafin would be down-regulated in oviducts with ectopic pregnancy.

The objective of this study was to analyze the protein expression of elafin on epithelial mucosa of Fallopian tubes with and without ectopic pregnancy. The importance of this study is justified by the potential use of elafin as an adjuvant treatment, as it has studied by others<sup>15</sup>.

### **Material And Methods**

In this is a 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. All stained tissues were examined by an expert pathologist, who confirmed the diagnosis of ectopic pregnancy and normal tubes. Tissue samples were obtained from total hysterectomy specimens for benign conditions (leiomyomas and dysfunctional uterine bleeding). Cases with cancer, unsatisfactory specimen in paraffin blocks, and acute salpingitis were excluded. Patient data, as age, parity and previous pelvic infections were obtained from patient electronic records.

### **Immunohistochemistry**

Immunohistochemical staining was performed as previously reported<sup>8</sup>, using the primary antibody against elafin (HM2063-0603 Hycult Biotechnology, Udem, The Netherlands) diluted at 1:10. The negative external controls were obtained by carrying out immunostaining without the primary antibody. Amygdale tissue, a known elafin positive specimen, was used as positive external control. Stained sections were analyzed under optical microscope (Olympus BX51 microscope - Olympus Optical Co., Tokyo,

Japan) connected to a digital color camera/Q-Color 5 (Olympus). Multiple pictures were taken from the whole slide when necessary to perform the immunohistochemical analysis. Images were obtained with a 4X objective UPLanFI (resolution: 2.75 $\mu$ m), at a size of 2560x1920 pixels (resolution: 1mm = 590 pixels), under standard lighting conditions.

### **ImageJ analyses**

Image analysis was performed by one of the authors (MG) after previous instructions by a senior researcher (RFS). In order to reduce bias, each slide was coded and blindly analyzed with specific image analysis software (ImageJ v1.43j; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA available at <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). After selecting the mucosal area inside the lumen of the oviduct, or the mucosa in the Fallopian tubes with ectopic pregnancy (the area of interest), the selected image was submitted to the analytical procedure named “color deconvolution” written as built in “plugin” for ImageJ, using the Hematoxylin and DAB built-in vector (HDAB) <sup>16;17</sup>. This built-in HDAB vector separates the digital image into 3 different panels: one with hematoxylin, a second panel with DAB only and a third panel with background. From the 3 images obtained from “color deconvolution”, the hematoxylin only picture was selected and converted into a binary picture. A “mask” was created to identify the region of interest (ROI manager), and it was saved in a file. The picture with diaminobenzidine (DAB) intensity was selected and the “mask” saved as a ROI file was overlaid on the image. 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,  $\bar{i}$  = mean DAB intensity obtained from the software. The final DAB intensity varied from 0 (white, no expression) to 255 (dark brown, highest expression).

### **Ethics, sample size calculation and statistical analysis**

Ethical approval for this study was obtained from of HCPA Ethics Committee under protocol 13-0107. Sample size for immunohistochemical analysis was calculated according to the formula:  $n = [(z\alpha + z\beta)^2 \cdot 2 \cdot (s)^2]/(d)^2$ , as described by Jekel<sup>18</sup>, using the following parameters: an alpha error ( $z\alpha$ )=0.05, power ( $z\beta$ )=0.8, an estimate standard deviation of elafin of 18 (thus variance  $(s)^2 = 324$ ) and a difference (d) to be found 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 18 cases of normal tubes. These figures yielded a sample size of at least 8 cases in each group.

GraphPad Prism version 5 for Macintosh (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA) was performed for statistical analysis, using unpaired Student's t-test with Welch correction to compare the expression of elafin (final DAB intensity) in tubal epithelium of the two groups, if data had a Gaussian distribution and different standard deviation. Mann Whitney's non parametric test was used for discrete variables. Association between categorical variables was tested with Fisher's exact test. A  $P < 0.05$  was considered significant.

### **Results**

Twenty samples were obtained (10 ectopic pregnancies; 10 controls). Characteristics of the sample are described in Table 1. Age, previous pelvic infection was significantly different between groups. Analysis of elafin expression and age in control group did not

show significant correlation (data not shown). All values for DAB intensity passed in the Kolmogorov-Smirnov normality test, and unpaired t-test with Welch correction was used.

Elafin immuno staining was localized in cytoplasm and in some cases inside the nucleus of the epithelial part of the mucosa in control group (Figure 1). Elafin protein expression was significantly reduced in mucosa of Fallopian tubes with ectopic pregnancy compared to controls (Figure 1: E to H). Its expression was consistently reduced in cases of ectopic pregnancy throughout the Fallopian tube, either at the site of ectopic implantation or in the normal section of the oviduct (Figure 1: A to D).

## **Discussion**

The most important function attributed to elafin is the protection of tissues against large proteolysis through serine proteinases<sup>19,20</sup>. The present study aimed to investigate whether the expression of elafin was increased or reduced on epithelial mucosa of Fallopian tubes with and without ectopic pregnancy. Well established immunohistochemical method combined with software for image analysis were used to demonstrate the elafin expression. In the present study, we demonstrated that levels of elafin are lower in ectopic pregnancy as opposed to non ectopic pregnancy tubes. Guyot et al. provided evidence that in the presence of excess neutrophil elastase elafin is cleaved<sup>21</sup>. Thus one may suggest that low levels of elafin observed in tubes with ectopic pregnancy are due to elevated neutrophil elastase levels with subsequent increased cleavage of elafin.

Comparing our results with current literature (Pubmed: elafin and ectopic pregnancy, no limits, accessed on January 4<sup>th</sup>, 2013), after excluding the reviews, only 2 articles were

identified. Dalgetty et al. compared expression of elafin in uterine decidua, not in tubal tissue, of women with intrauterine and tubal pregnancies using quantitative RT-PCR and immunohistochemistry. These authors did not find a significant difference in elafin expression neither in immunohistochemistry, nor in mRNA<sup>12</sup>. Nevertheless, King et al. investigated the localization and expression of elafin in the Fallopian tube with ectopic pregnancy (n=6); in addition, they evaluated the regulation elafin during in vitro chlamydial infection of an oviductal cell line<sup>7</sup>. Contrary to our findings, King et al. showed that elafin in epithelial mucosal with ectopic pregnancy was increased. An In vitro culture model of the OE-E6/E7 oviductal epithelial cell line infected with *C. trachomatis* infection showed that elafin mRNA expression was up regulated in response to chlamydial infection. Of note, mRNA analysis was made in whole tissue of ectopic pregnancy, and since this condition has an infiltrate of leukocytes, it may give a false up-regulated result. In addition, the authors did not present full data on immunohistochemical expression of elafin. Only one picture of immune staining was presented and the sample size calculation was not shown.

According to the data presented herein, it is reasonable to infer that increased elastase concentrations derived from neutrophils result in increased consumption of elafin and therefore, low levels of elafin would ensues.

Our study showed the sample size calculation in order to obtain the adequate power. The use of the ImageJ software to quantify DAB intensity instead of other semi-quantitative methods provides a non subjective estimation of the amount of antigen present. Moreover calculation of mean expression of DAB is made by the software, increasing objectivity and reproducibility. The calculation of the area analyzed did not

show a significant difference between both groups, therefore, it does not seem that the difference found was related to amount of tissue studied.

However, in this case-control analysis, there are some limitations that must be addressed. We were not able to investigate the presence of *C. trachomatis* in the sample, a known risk factor for tubal pregnancy. The use of laser capture to isolate the epithelial mucosa of the Fallopian tube would overcome the problem of contamination of neutrophils in the whole sample.

It would be possible that the trophoblastic tissue could be responsible to reduce the expression of elafin, or, in contrast, elafin expression would be reduced and ectopic pregnancy ensues. An in vitro study model with epithelial ovarian cells, and trophoblast invasion would clarify that.

In conclusion, this study showed that elafin expression is reduced in Fallopian tubes with ectopic pregnancy compared to normal tubes. This finding may open new frontiers to administer inhibitors of elastase to control unwanted proteolysis at inflammation sites, as it has already been used in a Phase II studies for cardiovascular disease<sup>22</sup> as an adjuvant treatment for coronary bypass surgery.

#### Reference List

1. Alkemade JA, Molhuizen HO, Ponc M, Kempenaar JA, Zeeuwen PL, de Jongh GJ, van Vlijmen-Willems IM, van Erp PE, van de Kerkhof PC, Schalkwijk J: SKALP/elafin is an inducible proteinase inhibitor in human epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* 1994;107 ( Pt 8):2335-2342.

2. Baranger K, Zani ML, Labas V, let-Choisy S, Moreau T: Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) is, like its homologue trappin-2 (pre-elafin), a transglutaminase substrate PLoS One 2011;6:e20976.
3. Wiedow O, Schroder JM, Gregory H, Young JA, Christophers E: Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. J Biol Chem 1990;265:14791-14795.
4. Sallenave JM: Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity Am J Respir Cell Mol Biol 2010;42:635-643.
5. van WS, van der Linden AC, van Sterkenburg MA, de Boer WI, Kuijpers AL, Schalkwijk J, Hiemstra PS: Regulation of SLPI and elafin release from bronchial epithelial cells by neutrophil defensins. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000;278:L51-L58.
6. King AE, Critchley HO, Sallenave JM, Kelly RW: Elafin in human endometrium: an antiprotease and antimicrobial molecule expressed during menstruation. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:4426-4431.
7. King AE, Wheelhouse N, Cameron S, McDonald SE, Lee KF, Entrican G, Critchley HO, Horne AW: Expression of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin in human fallopian tube and in an in-vitro model of Chlamydia trachomatis infection. Hum Reprod 2009;24:679-686.
8. Guedes Neto EP, Edelweiss MI, de Moraes GS, Cristovam RA, Savaris RF: The influence of hydrosalpinx on endometrial elafin expression. Fertil Steril 2011;95:2673-2675.

9. Alkemade HA, de Jongh GJ, Arnold WP, van de Kerkhof PC, Schalkwijk J: Levels of skin-derived antileukoproteinase (SKALP)/elafin in serum correlate with disease activity during treatment of severe psoriasis with cyclosporin A. *J Invest Dermatol* 1995;104:189-193.
10. Ectopic pregnancy mortality - Florida, 2009-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2012;61:106-109.
11. Barnhart, K. T. T., Sammel, M. D., Gracia, C. R., Chittams, J., Hummel, A. C., and Shaunik, A. Risk factors for ectopic pregnancy in women with symptomatic first-trimester pregnancies. *Fertil Steril* 86(1), 36-43. 1-7-2006.
12. Dalgetty DM, Sallenave JM, Critchley HO, Williams AR, Tham WY, King AE, Horne AW: Altered secretory leukocyte protease inhibitor expression in the uterine decidua of tubal compared with intrauterine pregnancy. *Hum Reprod* 2008;23:1485-1490.
13. Horne AW, Stock SJ, King AE: Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. *Reproduction* 2008;135:739-749.
14. King AE, Critchley HO, Kelly RW: Innate immune defences in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:116.
15. Shaw L, Wiedow O: Therapeutic potential of human elafin. *Biochem Soc Trans* 2011;39:1450-1454.
16. Ruifrok AC, Johnston DA: Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23:291-299.

17. 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.
18. Jekel FJ, Elmore JG, Kats DL: Sample size, randomization and probability theory. In *Epidemiology, Biostatistics, and Preventive Medicine*, FJ Jekel, JG Elmore, DL Kats (eds). Philadelphia, Saunders, 1996, pp 159-171.
19. Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gauldie J: Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11:733-741.
20. Nara K, Ito S, Ito T, Suzuki Y, Ghoneim MA, Tachibana S, Hirose S: Elastase inhibitor elafin is a new type of proteinase inhibitor which has a transglutaminase-mediated anchoring sequence termed "cementoin". *J Biochem* 1994;115:441-448.
21. Guyot N, Butler MW, McNally P, Weldon S, Greene CM, Levine RL, O'Neill SJ, Taggart CC, McElvaney NG: Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis. *J Biol Chem* 2008;283:32377-32385.
22. Scott CJ, Taggart CC: Biologic protease inhibitors as novel therapeutic agents. *Biochimie* 2010;92:1681-1688.

**Table 1.** Characteristics of the sample.

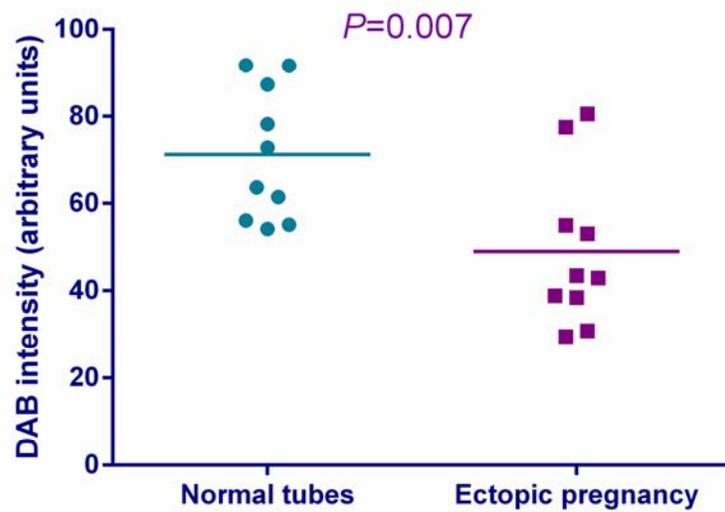
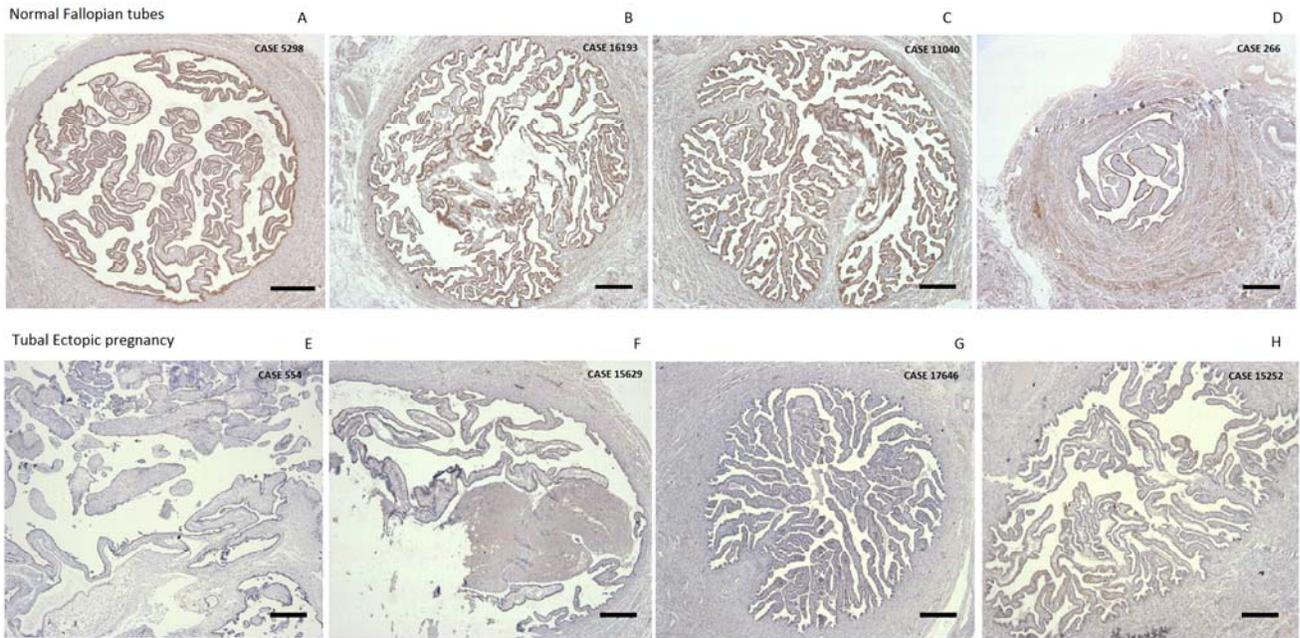
Characteristics	Normal tubes (n= 10)	Ectopic pregnancy (n=10)	P
Age - years (mean±SD)	47.5±10.21	30.3±3.77	<0.0001 <sup>a</sup>
Menarche - years (mean±SD)	12.9±1.66	12.5±1.27	0.5 <sup>a</sup>
Skin color - White/black	7/3	9/1	0.5 <sup>b</sup>
Previous pelvic infection n (%)	1 (10)	8 (80)	0.005 <sup>b</sup>
Pregnancies (median - range)	1.5 (1 to 3)	2.0 (1 to 4)	0.3 <sup>c</sup>
Area (mm <sup>2</sup> ) mean±SD	12.25±1.1	12.5±0.5	0.3 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Student's t-test

<sup>b</sup> Fisher's exact test

<sup>c</sup> Mann-Whitney test

**Figure 1** - Immunostaining for elafin in Fallopian tubes with and without ectopic pregnancy. Panels show representative images of tissue sections in 4 controls (A to D) and in 4 ectopic pregnancies (E to H). Scale bars represent 500µm. Graph below depicts individual values of DAB intensity in both groups. Unpaired Student's *t* test with Welch correction was used for analysis. Data had a Gaussian distribution. Bars represent the mean.



## **Artigo em Português**

Título

Expressão da elafina nas tubas uterinas em casos de gravidez ectópica

Título abreviado

Elafina na gravidez ectópica

Título resumido

Nível reduzido da elafina na gravidez ectópica

Palavras-chave

Elafina / Tuba uterina / Gravidez ectópica

Autores e afiliações

Melina GRUDZINSKI, PharmD, MSc <sup>1</sup>

Daniele G. FUHRICH, BSs <sup>2</sup>

Dr. Ricardo Francalacci SAVARIS, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas - Univ. Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Ginecologia e Obstetrícia -Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Suporte financeiro

Este trabalho teve o apoio da Fundação de Incentivo à Pesquisa e Ensino (FIPE) –  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Permissão 13-0107

Correspondência

Ricardo F Savaris

Serviço de Ginecologia e Obstetrícia - HCPA

Rua Ramiro Barcelos, 2350/1125, Porto Alegre, RS, 90035-903

Tel/Fax: 55 51 33598117

E-mail: [rsavaris@hcpa.ufrgs.br](mailto:rsavaris@hcpa.ufrgs.br)

## **RESUMO**

**Objetivo:** Comparar a expressão da elafina nas tubas uterinas em casos de gravidez normal e ectópica.

**Desenho do estudo:** Estudo de controle de casos. Foi realizada análise imunohistoquímica em secções teciduais em casos de gravidez ectópica (n=10) e em tubas normais (n=10) a partir de blocos de parafina, obtidas de indivíduos com caso confirmado de gravidez ectópica e que foram submetidos a salpingectomia devido a condições benignas (controle). A principal medida de resultado foi a intensidade da coloração com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) com a utilização do software ImageJ. A análise estatística foi realizada com o teste t não pareado.

**Conclusão:** A expressão da elafina é reduzida no epitélio das tubas de casos de gravidez ectópica em comparação às tubas de casos de gravidez não ectópica.

## INTRODUÇÃO

Elafina é um inibidor da serina protease, também conhecida como Inibidor Específico da Elastase, Trapina-2 ou antileucoprotease derivada da pele <sup>1;2</sup>. Essa proteína apresenta um baixo peso molecular e pertence à família das proteínas ácidas do soro do leite (WAP) <sup>3</sup>. Essa proteína secretada é produzida por células epiteliais e células do sistema imune <sup>4</sup>. Elafina demonstrou inibir a elastase de neutrófilos e apresenta ação antimicrobiana <sup>5</sup>. No endométrio, a expressão da elafina ocorre apenas durante as menstruações <sup>6</sup>; no entanto, na mucosa das tubas uterinas, sua expressão é constante durante o ciclo menstrual <sup>7</sup>.

Recentemente, nosso grupo publicou que mulheres com hidrossalpinge apresentaram uma expressão reduzida da elafina no endométrio <sup>8</sup>. Esse achado é o oposto dos encontrados em condições crônicas, como a psoríase, em que a expressão da elafina está com a sua expressão aumentada <sup>9</sup>.

A gravidez ectópica é uma condição que afeta 1-2% de todos os casos de gravidez <sup>10</sup>. Foi demonstrado que a lesão à tuba decorrente de infecção anterior é um fator de risco para gravidez tubária <sup>11</sup>.

A literatura atual que avalia a relação entre a elafina e a gravidez ectópica é escassa. Após uma pesquisa no PUBMED (Pesquisa no PUBMED: “ectopic pregnancy” E “elafin”, sem limites, de 1966 a janeiro de 2013, pesquisa realizada em 4 de janeiro de 2013), apenas 4 artigos foram identificados <sup>7;12-14</sup>. Destes, dois foram artigos de revisão <sup>13;14</sup>. Com a utilização de 6 casos de gravidez tubária, King et al. demonstraram que a expressão proteica da elafina e do RNAm estão com a suas expressões aumentadas <sup>7</sup>. No entanto, seus dados têm algumas limitações. A análise do RNAm foi realizada

usando todo o tecido de gravidez ectópica, e, como essa condição apresenta um infiltrado de leucócitos, pode haver um resultado falso indicando uma expressão aumentada. Além disso, os autores não apresentaram dados completos sobre a expressão imuno-histoquímica da elafina. Apenas uma fotografia da coloração imune foi apresentada. Em contraste, parece que o oviduto em risco para gravidez ectópica apresentaria uma condição crônica, em vez de uma infecção aguda, e, de acordo com os nossos resultados, a expressão proteica da elafina estaria diminuída <sup>8</sup>. Portanto, é plausível esperar que a elafina esteja reduzida nos ovidutos com gravidez ectópica.

O objetivo deste estudo foi analisar a expressão proteica da elafina na mucosa epitelial das tubas uterinas com e sem gravidez ectópica. A importância deste estudo é justificada pelo potencial uso da elafina como um tratamento adjuvante, como foi estudada por outros <sup>15</sup>.

### **Materiais e Métodos**

Neste estudo caso-controle, tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina foram obtidos dos arquivos do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), de 2010 a 2011. Todos os tecidos corados foram examinados por um patologista experiente, que confirmou o diagnóstico de gravidez ectópica e tubas normais. As amostras teciduais foram obtidas de amostras de histerectomia total realizada devido a condições benignas (leiomiomas e sangramento uterino disfuncional). Casos com câncer, amostra insatisfatória em blocos de parafina e salpingite aguda foram excluídos. Os dados das pacientes, como idade, paridade e infecções pélvicas anteriores, foram obtidos dos registros eletrônicos das pacientes.

### **Imuno-histoquímica**

Foi realizada coloração imuno-histoquímica conforme relatado anteriormente <sup>8</sup>, com a utilização de anticorpo primário contra a elafina (HM2063-0603 Hycult Biotechnology, Udem, Holanda) diluído em 1:10. Os controles externos negativos foram obtidos com a realização de imunocoloração sem anticorpo primário. Tecido da amígdala, uma amostra positiva para elafina conhecida, foi utilizado como o controle externo positivo. As secções coradas foram analisadas com um microscópio óptico (Microscópio Olympus BX51 - Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) conectado a uma câmera colorida digital/Q-Color 5 (Olympus). Diversas fotografias foram obtidas da lâmina toda, quando houve necessidade de realizar a análise imuno-histoquímica. As imagens foram obtidas com uma objetiva 4X UPLanFI (resolução: 2,75 µm), no formato de 2560 x 1920 pixels (resolução: 1 mm = 590 pixels), em condições padrão de iluminação.

### **Análise pelo ImageJ**

A análise das imagens foi realizada por um dos autores (MG) após orientações prévias de um pesquisador sênior (RFS). A fim de se reduzir desvios, cada lâmina foi codificada e analisada em modo cego com um software específico para análise de imagens (ImageJ v1.43j; National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Após a escolha da área da mucosa dentro do lúmen do oviduto ou da mucosa nas tubas uterinas com gravidez ectópica (a área de interesse [ROI]), a imagem escolhida foi encaminhada para o procedimento analítico denominado “deconvolução de cor”, presente como um “plugin” do ImageJ, com a utilização de Hematoxilina e vetor embutido DAB (HDAB) <sup>16 17</sup>. Esse vetor HDAB embutido separa a imagem digital em 3 diferentes painéis: um com hematoxilina, um segundo painel apenas com DAB e um terceiro painel com o fundo. Das 3 imagens obtidas a partir da “deconvolução de cor”, a imagem apenas com hematoxilina foi escolhida e convertida

em uma imagem binária. Uma “máscara” foi criada para identificar a região de interesse (gerenciador da ROI) e foi gravada em um arquivo. A imagem com a intensidade de diaminobenzidina (DAB) foi escolhida, e a “máscara” gravada como um arquivo da ROI foi sobreposta à imagem. A intensidade da coloração de DAB e a área total foram medidas pelo software, produzindo uma intensidade média da imunocoloração com DAB a partir da ROI. Quando diversas fotografias foram obtidas da mesma amostra, a intensidade média da DAB foi calculada. A intensidade final da DAB foi calculada de acordo com a fórmula:  $f=255 - i$ , onde  $f$ = intensidade final da DAB,  $i$ = intensidade média da DAB obtida do software. A intensidade final da DAB variou de 0 (branco, sem expressão) a 255 (marrom escuro, expressão mais alta).

### **Ética, cálculo do tamanho da amostra e análise estatística**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA, sob o protocolo 13-0107. O tamanho da amostra para a análise imuno-histoquímica foi calculado de acordo com a fórmula:  $n=[(z\alpha + z\beta)^2 \cdot 2 \cdot (s)^2]/(d)^2$ , conforme descrita por Jekel <sup>18</sup>, com a utilização dos seguintes parâmetros: erro alfa ( $z\alpha$ )=0,05, poder ( $z\beta$ )=0,8, desvio padrão calculado da elafina igual a 18 (variância resultante  $(s)^2 = 324$ ) e uma diferença (d) a ser observada de 25 pontos em uma escala que varia de 0 a 255 (ou seja, uma diferença de 10%). A variância foi obtida a partir de um estudo piloto com 18 casos de tubas normais. Esses números produziram um tamanho de amostra de, no mínimo, 8 casos em cada grupo.

GraphPad Prism versão 5 para Macintosh (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, EUA) foi utilizado para a análise estatística, com o uso do teste t de Student não-pareado com correção de Welch para comparar a expressão da elafina (intensidade final da DAB) no epitélio tubário dos dois grupos, se os dados apresentassem uma distribuição Gaussiana e desvio padrão diferente. O teste não paramétrico de Mann

Whitney foi utilizado para variáveis sem distribuição Gaussiana. A associação entre variáveis categóricas foi testada com o teste exato de Fisher. Um  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

## **Resultados**

Vinte amostras foram obtidas (10 de casos de gravidez ectópica; 10 controles). As características da amostra estão descritas na Tabela 1. Idade e infecção pélvica anterior foram significativamente diferentes entre os grupos. A análise da expressão da elafina e da idade no grupo controle não revelou correlação significativa (dados não exibidos). Todos os valores para a intensidade da DAB passaram no teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, e o teste t não pareado com correção de Welch foi utilizado.

Coloração imune da elafina foi localizada no citoplasma e, em alguns casos, dentro do núcleo da parte epitelial da mucosa no grupo controle (Figura 1). A expressão proteica da elafina estava significativamente reduzida na mucosa das tubas uterinas com gravidez ectópica, em comparação aos controles (Figura 1: E a H). Sua expressão esteve consistentemente reduzida nos casos de gravidez ectópica em toda a tuba uterina, seja no local da implantação ectópica ou na seção normal do oviduto (Figura 1: A a D).

## **Discussão**

A função mais importante atribuída à elafina é a proteção de tecidos contra proteólise extensa por meio de serina proteinases<sup>19;20</sup>. O objetivo do presente estudo foi investigar se a expressão da elafina estava elevada ou reduzida na mucosa epitelial das tubas uterinas com e sem gravidez ectópica. Foi utilizado um método imuno-histoquímico consagrado em combinação com software para análise de imagens para demonstrar a expressão da elafina. No presente estudo, demonstramos que os níveis da elafina são

inferiores na gravidez ectópica, em oposição às tubas em casos de gravidez não ectópica. Guyot et al. forneceram evidências de que, na presença de excesso de elastase de neutrófilos, a elafina é clivada <sup>21</sup>. Portanto, pode-se sugerir que os níveis reduzidos da elafina observados nas tubas com gravidez ectópica são decorrentes dos níveis elevados de elastase dos neutrófilos com subsequente clivagem elevada da elafina.

Comparando nossos resultados com a atual literatura (Pubmed: “elafin” e “ectopic pregnancy”, sem limites, pesquisa acessada em 4 de janeiro de 2013), após a exclusão das revisões, apenas 2 artigos foram identificados. Dalgetty et al. compararam a expressão da elafina na decídua uterina, não no tecido tubário, de mulheres com casos de gravidez intrauterina e tubária, com a utilização de RT-PCR quantitativa e imuno-histoquímica. Esses autores não encontraram uma diferença significativa na expressão da elafina, seja na imuno-histoquímica ou no RNAm <sup>12</sup>. No entanto, King et al. investigaram a localização e a expressão da elafina na tuba uterina com gravidez ectópica (n=6); além disso, avaliaram a regulação da elafina durante a infecção por *Chlamydia* in vitro de uma linhagem celular de oviduto <sup>7</sup>. Ao contrário de nossos achados, King et al. demonstraram que a elafina na mucosa epitelial com gravidez ectópica estava elevada. Um modelo de cultura in vitro da linhagem celular epitelial de ovidutos OE-E6/E7 infectada com *C. trachomatis* demonstrou que a expressão do RNAm da elafina estava suprarregulada em resposta à infecção por *Chlamydia*. Vale ressaltar que a análise do RNAm foi realizada em tecido integral de gravidez ectópica e, uma vez que essa condição apresenta um infiltrado de leucócitos, pode haver um resultado falso indicando suprarregulação. Além disso, os autores não apresentaram dados completos sobre a expressão imuno-histoquímica da elafina. Apenas uma

fotografia de coloração imune estava presente, e o cálculo do tamanho da amostra não foi exibido.

De acordo com os dados aqui apresentados, é razoável inferir que as concentrações elevadas de elastase derivada dos neutrófilos resultam em consumo aumentado da elafina, resultando, portanto, em níveis reduzidos da elafina.

Nosso estudo demonstrou o cálculo do tamanho da amostra para a obtenção de poder adequado. O uso do software ImageJ para quantificação da intensidade da DAB, em vez de outros métodos semi-quantitativos, fornece uma estimativa não subjetiva da quantidade de antígeno presente. Além disso, o cálculo da expressão média da DAB é realizado pelo software, aumentando a objetividade e a reprodutibilidade. O cálculo da área analisada não revelou uma diferença significativa entre ambos os grupos; portanto, não parece que a diferença encontrada foi relacionada à quantidade de tecido estudada.

No entanto, nessa análise de controle de casos, há algumas limitações que devem ser abordadas. Não fomos capazes de investigar a presença de *C. trachomatis* na amostra, um fator de risco conhecido para gravidez tubária. O uso de captura por laser para isolar a mucosa epitelial da tuba uterina superaria o problema de contaminação de neutrófilos na amostra completa.

É possível que o tecido trofoblástico seja responsável pela redução da expressão da elafina ou, em contraste, a expressão da elafina estaria reduzida, o que resultaria em gravidez ectópica. Um modelo de estudo in vitro com células ovarianas epiteliais e invasão de trofoblastos esclareceria isso.

Concluindo, esse estudo demonstrou que a expressão da elafina está reduzida nas tubas uterinas com gravidez ectópica em comparação a tubas normais. Esse achado pode abrir

novas fronteiras para a administração de inibidores de elastase para o controle de proteólise indesejada em sítios de inflamação, uma vez que já foram utilizados em estudos de Fase II sobre doença cardiovascular<sup>22</sup> como um tratamento adjuvante para cirurgia de revascularização coronariana.

#### Referências bibliográficas

1. Alkemade JA, Molhuizen HO, Ponc M, Kempenaar JA, Zeeuwen PL, de Jongh GJ, van Vlijmen-Willems IM, van Erp PE, van de Kerkhof PC, Schalkwijk J: SKALP/elafin is an inducible proteinase inhibitor in human epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* 1994;107 ( Pt 8):2335-2342.

2. Baranger K, Zani ML, Labas V, let-Choisy S, Moreau T: Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) is, like its homologue trappin-2 (pre-elafin), a transglutaminase substrate. *PLoS One* 2011;6:e20976.

3. Wiedow O, Schroder JM, Gregory H, Young JA, Christophers E: Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1990;265:14791-14795.

4. Sallenave JM: Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010;42:635-643.

5. van WS, van der Linden AC, van Sterkenburg MA, de Boer WI, Kuijpers AL, Schalkwijk J, Hiemstra PS: Regulation of SLPI and elafin release from bronchial

epithelial cells by neutrophil defensins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:L51-L58.

6. King AE, Critchley HO, Sallenave JM, Kelly RW: Elafin in human endometrium: an antiprotease and antimicrobial molecule expressed during menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4426-4431.

7. King AE, Wheelhouse N, Cameron S, McDonald SE, Lee KF, Entrican G, Critchley HO, Horne AW: Expression of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin in human fallopian tube and in an in-vitro model of *Chlamydia trachomatis* infection. *Hum Reprod* 2009;24:679-686.

8. Guedes Neto EP, Edelweiss MI, de Moraes GS, Cristovam RA, Savaris RF: The influence of hydrosalpinx on endometrial elafin expression. *Fertil Steril* 2011;95:2673-2675.

9. Alkemade HA, de Jongh GJ, Arnold WP, van de Kerkhof PC, Schalkwijk J: Levels of skin-derived antileukoproteinase (SKALP)/elafin in serum correlate with disease activity during treatment of severe psoriasis with cyclosporin A. *J Invest Dermatol* 1995;104:189-193.

10. Ectopic pregnancy mortality - Florida, 2009-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2012;61:106-109.

11. Barnhart, K. T. T., Sammel, M. D., Gracia, C. R., Chittams, J., Hummel, A. C., and Shaunik, A. Risk factors for ectopic pregnancy in women with symptomatic first-trimester pregnancies. *Fertil Steril* 86(1), 36-43. 1-7-2006.

12. Dalgetty DM, Sallenave JM, Critchley HO, Williams AR, Tham WY, King AE, Horne AW: Altered secretory leukocyte protease inhibitor expression in the uterine

decidua of tubal compared with intrauterine pregnancy. *Hum Reprod* 2008;23:1485-1490.

13. Horne AW, Stock SJ, King AE: Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. *Reproduction* 2008;135:739-749.

14. King AE, Critchley HO, Kelly RW: Innate immune defences in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:116.

15. Shaw L, Wiedow O: Therapeutic potential of human elafin. *Biochem Soc Trans* 2011;39:1450-1454.

16. Ruifrok AC, Johnston DA: Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23:291-299.

17. Helms 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.

18. Jekel FJ, Elmore JG, Kats DL: Sample size, randomization and probability theory. In *Epidemiology, Biostatistics, and Preventive Medicine*, FJ Jekel, JG Elmore, DL Kats (eds). Philadelphia, Saunders, 1996, pp 159-171.

19. Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gauldie J: Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11:733-741.

20. Nara K, Ito S, Ito T, Suzuki Y, Ghoneim MA, Tachibana S, Hirose S: Elastase inhibitor elafin is a new type of proteinase inhibitor which has a transglutaminase-mediated anchoring sequence termed "cementoin". *J Biochem* 1994;115:441-448.
21. Guyot N, Butler MW, McNally P, Weldon S, Greene CM, Levine RL, O'Neill SJ, Taggart CC, McElvaney NG: Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis. *J Biol Chem* 2008;283:32377-32385.
22. Scott CJ, Taggart CC: Biologic protease inhibitors as novel therapeutic agents. *Biochimie* 2010;92:1681-1688.

**Tabela 1.** Características da amostra.

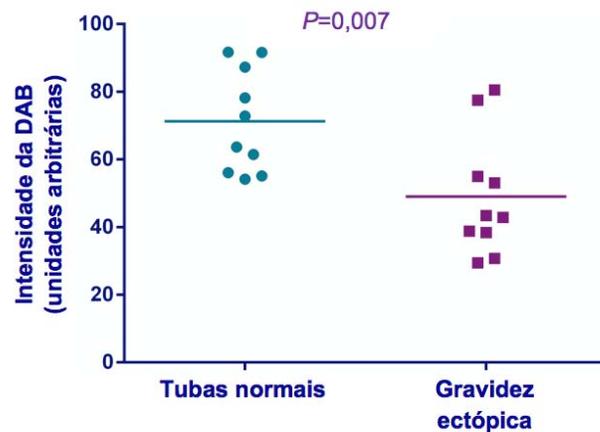
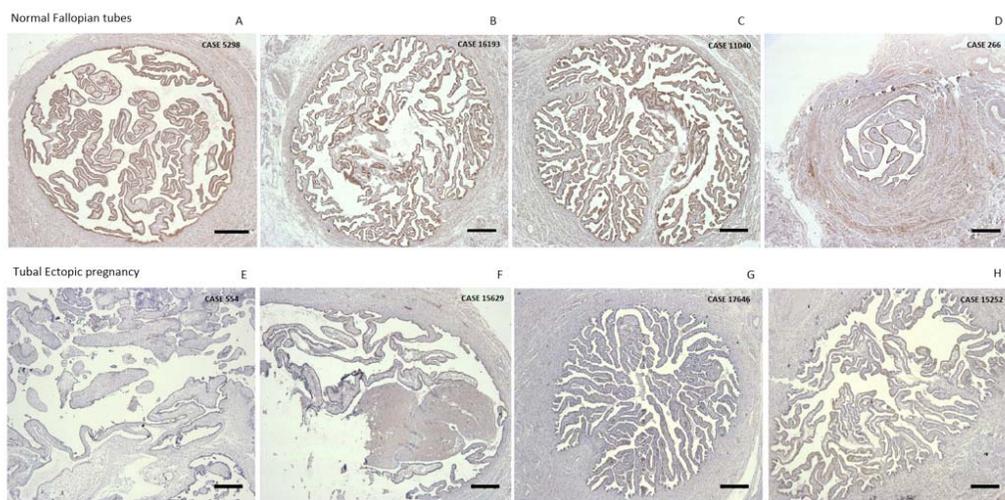
Características	Tubas normais (n= 10)	Gravidez ectópica (n=10)	P
Idade - anos (média±DP)	47,5±10,21	30,3±3,77	<0,0001 <sup>a</sup>
Menarca - anos (média ±DP)	12,9±1,66	12,5±1,27	0,5 <sup>a</sup>
Cor da pele – Branca/negra	7/3	9/1	0,5 <sup>b</sup>
Infecção pélvica anterior, n (%)	1 (10)	8 (80)	0,005 <sup>b</sup>
Gestações (mediana - variação)	1,5 (1 a 3)	2,0 (1 a 4)	0,3 <sup>c</sup>
Área (mm <sup>2</sup> ) média±DP	12,25±1,1	12,5±0,5	0,3 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Teste t de Student

<sup>b</sup> Teste exato de Fisher

<sup>c</sup> Teste de Mann-Whitney

**Figura 1** - Coloração para elafina nas tubas de Falópio com e sem gravidez ectópica. As fotomicrografias representam imagens de cortes individuais de 4 casos controles (A a D) e de 4 casos diferentes de gravidez ectópica (E a H). Escala representa 500µm. O gráfico abaixo contém os valores individuais da intensidade do DAB nos dois grupos. Teste t de Student não-pareado com correção de Welch foi usado para a análise estatística. Os dados apresentavam uma distribuição Gaussiana. A barra representa a média.



# Anexo 1

Submissão do artigo a revista indexada

Julia Mauchline <julia.mauchline@editorialoffice.co.uk>  
Para: Ricardo Savaris  
PLOS ONE Author Notice: Passed Tech Check

3 de abril 2013 19:34

[Entrada - HCPA](#)

---

Elafin expression in mucosa of human Fallopian tubes is altered by ectopic pregnancy.

Dear Prof. Savaris,

This is a notice that your submission has now cleared our preliminary checks for technical requirements. Please note that additional checks may be necessary after your manuscript has received a first decision. A full list of our submission requirements can be found on this page of our website: <http://www.plosone.org/static/submissionInstructions.action>.

No further action is required from you at this time. Next, our in-house editors will verify that your manuscript meets our basic criteria and follows all journal policies before it is moved forward to review with an Academic Editor.

Thank you for submitting your work to PLOS ONE.

Kind regards,

Julia Mauchline  
PLOS ONE