UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM TECIDO
ENDOMETRIAL TÓPICO E LESÕES ENDOMETRIÓTICAS

Daniel Blassioli Dentillo

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM TECIDO
ENDOMETRIAL TÓPICO E LESÕES ENDOMETRIÓTICAS

Daniel Blassioli Dentillo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para concorrer ao título de Doutor,
pelo curso de Pós-Graduação em
Genética.

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM TECIDO
ENDOMETRIAL TÓPICO E LESÕES ENDOMETRIÓTICAS

Daniel Blassioli Dentillo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para concorrer ao título de Doutor,
pelo curso de Pós-Graduação em
Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia R. Martelli

Ribeirão Preto
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Dentillo, Daniel Blassioli

Expressão gênica diferencial em tecido endometrial e lesões endometrióticas.

Ribeirão Preto, São Paulo, 2007.

83 p.: il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/
USP – Área de concentração: Genética.

Orientadora: Martelli, Lúcia R.

1. Endometriose, 2. RaSH, 3. Expressão gênica, 4. *LOXL1*, 5. *HTRAI*

Data da Defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Vim pelo caminho difícil,
a linha que nunca termina,
a linha que bate na pedra,
a palavra quebra uma esquina,
mínima linha vazia,
a linha, uma vida inteira,
palavra, palavra minha.*

Paulo Leminski

DEDICATÓRIA

*Dedico a minha família e meus amigos
que sempre me participaram de todas as
decisões de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus...

À Profa. Dra. Lúcia Regina Martelli, agradeço pela orientação e apoio...

Ao Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani e Dr. Júlio César Rosa e Silva, agradeço a atenção e amostras cedidas...

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior, agradeço ao suporte técnico...

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone, agradeço ao suporte técnico

À Profa. Dra. Silvana Giuliatti e o mestrando Renato Puga, do Grupo de Bioinformática (GBI), agradeço pelo suporte estatístico...

Aos Profs. Dr. Raysildo Lôbo e Dra. Ester Silveira Ramos, agradeço pelo convívio agradável...

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP- USP).

Ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Aos técnicos do Laboratório de Genética do Bloco C, em especial Sílvio A. Santos, Marli A. V. Galerani e Reginaldo A Vila.

Ao meu grupo de pesquisa Ana Carolina Laus, Fábio R Pablos, Fernando H Biase, Gismar Vieira, Juliana Cuzzi, Juliana Meola, Luciana C. Veiga, Maria Silvina J. de Vozzi e Reginaldo Justino Ferreira.

Aos amigos Adriane, Alejandro, Álvaro, Andrea, Dante, Fernanda, Flávia, Francielle, Hélida, Jair, Jaqueline, Jéferson, Kéllen, Lisandra, Marcelo, Marcus Vinícius, Maurício, Murilo, Patrícia, Bloco C do Departamento de Genética (FMRP).

À equipe do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática (LGMB), em especial Lidiane C. Melato, Fernanda G. Barbuzano, Anemari Ramos Dinarte dos Santos e Daniel G. Pinheiro.

À equipe do Laboratório de Oncologia Pediátrica, em especial Profa. Dra. Agda Karina Brodoloni Eterovic, Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli, Profa. Dra. Rosane de Paula Gómes Queiroz e aos doutorandos Fábio Motta, Vanessa Andrade, Maria Angélica Abdalla de Freitas Cortez.

À minha Família...

À minha namorada...

Ao Programa de Excelência Acadêmica da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROEX/CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX/CNPq) e Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) pelo apoio financeiro.

RESUMO

DENTILLO, D.B. **Expressão gênica diferencial em tecido endometrial tópico e lesões endometrióticas.** 2007. 83 p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Perdas gestacionais podem ser determinadas por vários fatores, dentre eles a endometriose, doença ginecológica comum caracterizada pela presença e crescimento de glândulas e estroma endometrial fora da cavidade uterina. Os principais sintomas da doença envolvem, além de problemas de fertilidade, dismenorréia, dispneúria, dor pélvica crônica e irregularidades menstruais. Os locais mais frequentes das lesões endometrióticas são o peritônio e os órgãos pélvicos, principalmente ovários. A incidência da endometriose é difícil de ser determinada devido à grande variabilidade de sintomas e à dificuldade para confirmação diagnóstica, que requer método cirúrgico. Estima-se que 15% da população feminina em idade reprodutiva seja afetada pela doença, sendo sua patogênese pouco conhecida. A hipótese mais aceita é a da menstruação retrógrada, onde os fragmentos endometriais descamados durante a fase menstrual seriam transportados através das tubas uterinas até a cavidade peritoneal com implantação, crescimento e invasão local e de órgãos adjacentes. No entanto, apenas o refluxo não é suficiente para o estabelecimento da doença, sendo necessário que as células endometriais possuam certas características moleculares que favoreçam o aparecimento e a progressão da implantação ectópica. Vários estudos na literatura evidenciam que as principais divergências moleculares entre portadoras e não portadoras de endometriose estão relacionadas a processos envolvidos na apoptose, adesão celular, angiogênese, biosíntese de estrógeno, sistema imune, além de fatores de crescimento e metaloproteinases. Sendo assim, as pesquisas buscam a investigação de genes que se expressem diferencialmente (maior ou menor expressão) nas células de lesões endometrióticas por meio de várias técnicas. A hibridação subtrativa é uma metodologia de

screening gênico que compara dois grupos celulares distintos, permitindo isolar moléculas de cDNA representantes do genoma de somente um dos dois grupos, pois remove as seqüências comuns entre eles. A técnica de hibridação subtrativa rápida (*RaSH*) simplifica e torna mais eficiente esse processo de subtração, identificando grande quantidade de seqüências diferencialmente expressas. Com objetivo de determinar possíveis marcadores moleculares para diagnóstico e tratamento da doença, aplicamos a técnica de *RaSH* para identificação de genes com expressão diferencial em 11 amostras de lesões endometrióticas (cinco de origem ovariana e seis de origem peritonal) e em 11 amostras de tecido endometrial típico de mulheres sem a doença. Após análise dos dados referentes a 166 seqüências de referência, os genes *HTRAI*, *LOXLI*, *SPARC* e *SSAT* foram selecionados para validação por meio da técnica de RT-PCR quantitativa em tempo real, sendo que apenas os dois primeiros mostraram diferença significativa entre os dois grupos estudados. Os genes *HTRAI* e *LOXLI* apresentaram expressão aumentada em lesões endometrióticas de pacientes afetadas, quando comparada aos níveis de expressão no tecido endometrial de mulheres não afetadas. Os resultados obtidos sugerem que os genes *HTRAI* e *LOXLI* podem ser considerados candidatos a marcadores moleculares para o diagnóstico.

ABSTRACT

DENTILLO, D.B. **Genes differentially expressed in topic endometrium and endometriotic lesions**. 2007. 83 p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Gestational losses can be determined by a number of factors including endometriosis, a common gynecological disease characterized by endometrial tissue found outside the uterine cavity. The main symptoms of the disease involve dysmenorrhea, dyspareunia, chronic pelvic pain and menstrual irregularities, besides fertility problems. Endometriotic lesions are more frequently found in the peritoneum and in pelvic organs, mainly ovaries. Endometriosis incidence is difficult to be determined due to the wide variability of the symptoms and the difficult diagnostic confirmation, which requires a surgical method. Nevertheless, it is believed that around 15% of the female population in reproductive age is affected by the disease, although its pathogenesis remains unclear. The most accepted hypothesis is the retrograde menstruation, where endometrial fragments from the menstrual phase are transported through the uterine tubes to the peritoneal cavity, where they undergo implantation, growth, and adjacent tissues invasion. However, only reflux is not enough for the disease establishment, and it is necessary that endometrial cells present molecular characteristics favoring rise and progression of ectopic implantation. In the literature, a number of studies highlight that the main molecular divergences between women with and without endometriosis are related to processes involved in apoptosis, cellular adhesion, angiogenesis, estrogen biosynthesis, immunological system, growth factors and metalloproteinases. In doing so, a number of researches seek for the investigation of genes differently expressed (up or down regulated) in endometriotic lesions cells using a variety of methodologies. The subtractive hybridization is a gene screening methodology that compares two distinct cellular groups, allowing the isolation of cDNA molecules representative from

the genome of only one of the two groups, because it removes common sequences among them. The rapid subtractive hybridization methodology (*RaSH*) makes the process of subtraction easier and more efficient, identifying a large amount of differently expressed sequences. In this study, *RaSH* was used to identify differently expressed genes in 11 samples of endometriotic lesions (five from ovarian origin and six from peritoneum origin), and in 11 samples from topic endometrial tissue from women without the disease to determine possible molecular markers for diagnosis and treatment. After data analysis related to 166 reference sequences, genes *HTRA1*, *LOXLI*, *SPARC* and *SSAT* were selected for validation using real time quantitative RT-PCR. Only *HTRA1* and *LOXLI* presented significant difference between the two studied groups. Genes *HTRA1* and *LOXLI* were up regulated in endometriotic lesions from affected patients when compared with the expression levels in the endometrial tissue of non-affected women. Our results suggest that the genes *HTRA1* and *LOXLI* can be considered candidate molecular markers for the diagnosis of endometriosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A) Amostras de cDNAs obtidos a partir dos tecidos analisados transcrição reversa, restrição enzimática com DpnII e ligação dos adaptadores; B) PCR com *primers* XDPN-18 e restrição enzimática somente da amostra *tester*, representada pela lesão endometriótica; C) Mistura das amostras *tester* e *driver*, seguida de reação de hibridação; D) Representação dos híbridos gerados, ligação do híbrido *tester-tester* ao plamídeo tratado com a enzima de restrição XhoI, transformação bacteriana, plaqueamento e seqüenciamento dos insertos clonados.

Figura 2: Curva de calibração do gene *LOXLI*. Foi plotada a fluorescência da amplificação versus o número de ciclos da PCR

Figura 3: Curva-padrão do gene *LOXLI* obtida a partir da curva de calibração.

Figura 4: Diagrama de pontos interativos (*interactive dot*) para o gene *HTRAI* obtido a partir do *software* MedCalc (<http://www.medcalc.be>). O eixo vertical representa valores de RQ. Os pontos do gráfico mostram a distribuição dos valores das RQs obtidas nos grupos de mulheres sem endometriose (representados no eixo horizontal como “Normal=0”) e nas amostras do grupo de mulheres com a doença (representados no eixo horizontal como “Normal=1”). A barra horizontal mostra o melhor ponto de corte para separação dos grupos.

Figura 5: Diagrama de pontos interativos (*interactive dot*) para o gene *LOXLI* obtido a partir do *software* MedCalc (<http://www.medcalc.be>). O eixo vertical representa valores de RQ. Os pontos do gráfico mostram a distribuição dos valores das RQs obtidas nos grupos de mulheres sem endometriose (representados no eixo horizontal como “Normal=0”) e nas amostras do grupo de mulheres com a doença (representados no eixo horizontal como “Normal=1”). A barra horizontal mostra o melhor ponto de corte para separação dos dois grupos.

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Seqüências de referência obtidas pela RaSH nas bibliotecas RHENDI e RHENDW.

Tabela II: Valores de RQ, médias e desvios-padrão dos grupos de tecido normal e lesão endometriótica para o gene *SPARC*.

Tabela III: Valores de RQ, médias e desvios-padrão dos grupos de tecido normal e lesão endometriótica para o gene *SSAT*.

Tabela IV: Valores de RQ, médias e desvios-padrão dos grupos de tecido normal e lesão endometriótica para o gene *HTRA1*.

Tabela V: Valores de RQ, médias e desvios-padrão dos grupos de tecido normal e lesão endometriótica para o gene *LOXLI*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 β -HSD2 - *Hydroxysteroid (11-beta) Dehydrogenase 2*
AGDE - Ambulatório de Dor Pélvica e Endoscopia
ASRM - *American Society for Reproductive Medicine*
B61 – aliase do gene *EFNA1* (epherin A1)
Bcl-2 - *B-cell CLL/lymphoma 2*
BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
BSEP – *Bile Salt Export Pump*
C4BP - *Complement Component 4 Binding Protein*
CA 19-9 - *Carbohydrate Antigen 19-9*
CA-125 - *Carbohydrate Antigen 125*
cDNA – *complementary Deoxyribonucleic Acid*
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
c-Myc - *cellular Myelocytomatosis oncogene*
CYP1A1 - *cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1*
DC21- aliase do gene *SSAT* (*Spermidine/Spermine N(1)-Acetyltransferase*)
DEPC - Dietil Pirocarbonato
DLX5 - *Distal-Less Homeobox 5*
DNA - *Deoxyribonucleic Acid*
EGF - *Epidermal Growth Factor*
EST - *Expressed Sequence Tag*
FBLN1 - *Fibulin 1*
FGF - *Fibroblast Growth Factor*
FMRP-USP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
GALT - *Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase*
GAPDH – *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*
Geap - *Generic EST Annotation Pipeline*
GlcNAc6ST - *N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase*
GMST1 - *Macrophage Stimulating 1*
GnRH - *Gonadotropin-Releasing Hormone*
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
HCl – Cloreto de Hidrogênio

HLA – *Major Histocompatibility Complex*

HTRA1 - *High Temperature Requirement Factor A1 - serine peptidase 1*

ICAM-1 - *Intercellular Adhesion Molecule-1*

IGFBP5– *Insulin-Like Growth Factor Binding-Protein 5*

IL-1 - *Interleukin 1*

IL-15 - *Interleukin 15*

IL2RG - *Interleukin 2 Receptor, Gamma*

IL-6 – *Interleukin 6*

IL-8 – *Interleukin 8*

KFSD - *keratosis Follicularis Spinulosa Decalvans* (aliase do gene *Spermidine/Spermine N(1)-Acetyltransferase*)

KH₂PO₄ - *Fosfato de Potássio Monobásico*

L56 - aliase do gene *HTRA1* (*High Temperature Requirement Factor A1 - serine peptidase 1*)

LB- *Lysogeny Broth*

LIF - *Leukemia Inhibitory Factor*

LOL – aliase do gene *LOXL1* (*Lysyl Oxidase-Like 1*)

LoTE – *Low Tris-EDTA*

LOXL1 - *Lysyl Oxidase-Like 1*

MEC - *Matriz Extracelular*

MMP11 - *Matrix Metalloproteinase 11*

MMP12 - *Matrix Metalloproteinase 12*

MMP-2 - *Matrix Metalloproteinase 2*

MMP3 - *Matrix Metalloproteinase 3*

Na₂HPO₄.12H₂O - *Fosfato de Sódio Monobásico Dodecahidratado*

NaCl - *Cloreto de Sódio*

NAT2 - *N-Acetyltransferase 2*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NLM - *National Library of Medicine*

OMIM - *Online Mendelian Inheritance in Man*

ON – aliase do gene *SPARC* (*Secreted Protein, Acidic, Cysteine-rich (Osteonectin)*)

ORF480 - aliase do gene *HTRA1* (*High Temperature Requirement Factor A1 - serine peptidase 1*)

p53 – aliase do gene *TP 53* (*Tumor Protein p53*)

PBS - *Phosphate-Buffered Saline*

PCR - Polymerase Chain Reaction

PRSS11 - aliase do gene *HTRA1* (*High Temperature Requirement Factor A1* - serine peptidase 1)

PSAP – Prosaposin

PTEN – Phosphatase and Tensin Homolog

RaSH – Rapid Subtraction Hybridization

RefSeq – Reference Sequences

RHENDI – biblioteca de cDNAs do grupo de mulheres com endometriose (tester)

RHENDW - biblioteca de cDNAs do grupo de mulheres não afetadas pela endometriose (tester)

RhoE - Ras Homolog Gene Family, Member E

RNA- Ribonucleic Acid

ROC - Receiver-Operating Characteristic

RQ - Relative Quantification

RT-PCR – Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction

SAT – aliase do gene SSAT (Spermidine/Spermine N(1)-Acetyltransferase)

SPARC - Secreted Protein, Acidic, Cysteine-rich (Osteonectin)

SSAT - Spermidine/Spermine N(1)-Acetyltransferase

TGF- α – Transforming Growth Factor Alfa

TGF- β – Transforming Growth Factor Beta

TIMP-3 – Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3

TNF- α – Tumor Necrosis Factor Alfa

TP53 - Tumor Protein p53

UniGene – link do site www.ncbi.nlm.nih.gov que contém informações a respeito de conjuntos de seqüências (gene ou pseudogene) que aparentemente são transcritos no mesmo locus.

VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

°C – graus Celsius

µg – microgramas

µL – microlitros

g – gramas

L – litros

M – molar

mg – miligramas

mL – mililitros

mM - milimolar

RPM – rotações por minuto

U – unidades

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
I. INTRODUÇÃO	01
I.1. ENDOMETRIOSE	02
I.1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	02
I.1.2. ASPECTOS GENÉTICOS DA ENDOMETRIOSE	07
I.1.3. ASPECTOS MOLECULARES E PATOGÊNESE	08
I.2. METODOLOGIA DE INVESTIGAÇÃO MOLECULAR	11
I.3. JUSTIFICATIVA	14
II. OBJETIVOS	15
III. MATERIAL E MÉTODOS	16
III.1. AMOSTRAS	16
III.2. METODOLOGIA	17
III.2.1 ISOLAMENTO DO RNA TOTAL	17
III.2.2. <i>RAPID SUBTRACTION HYBRIDIZATION (RASH)</i>	18
III.2.2.1. SÍNTESE DE cDNA	21
III.2.2.2. DIGESTÃO ENZIMÁTICA E LIGAÇÃO DOS ADAPTADORES	21
III.2.2.3. PCR E PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS	21
III.2.2.4. DIGESTÃO DO <i>TESTER</i> E HIBRIDAÇÃO SUBTRATIVA	22
III.2.2.5. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA E GERAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE cDNA	22
III.2.2.6. ANÁLISE DAS COLÔNIAS E OBTENÇÃO DOS DADOS	23
III.2.3. VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES SELECIONADOS	26
III.2.3.1. SÍNTESE DE cDNA	26
III.2.3.2. EFICIÊNCIA DA REAÇÃO	26
III.2.3.3. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	28
III.2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
IV. RESULTADOS	30
IV.1. OBTIDOS PELA TÉCNICA DE <i>RASH</i>	30

IV.2. GENES SELECIONADOS	47
IV.3. RT-PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL	48
IV.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
V. DISCUSSÃO	53
V.1. <i>HTRA1</i> – Htra (<i>High Temperature Requirement Factor A1</i>) Serine Peptidase 1	54
V.2. <i>LOXL1</i> – lysyl oxidase – like 1	57
V. 3. <i>SPARC</i> – secreted protein, acidic, cystein – rich (osteonectin)	60
V.4. <i>SSAT</i> – spermidine/spermine N1 – acetyltransferase	62
VI. CONCLUSÕES	65
VII. REFERÊNCIAS	66
ANEXOS	84

I. INTRODUÇÃO

Infertilidade é definida como a incapacidade do casal em obter gravidez após um ano de relacionamento sexual, sem uso de métodos anticoncepcionais (Healy *et al.*, 1994; Gnoth *et al.*, 2005). Cerca de 10 a 15% dos casais são inférteis e aproximadamente 70% das gestações não chegam a termo, sendo que 50 a 60% das perdas fetais ocorrem no primeiro mês e 1% dos casais apresentam perdas recorrentes (Bulletti *et al.*, 1996; Mercorio *et al.*, 2006). Estima-se que 48% dos casos de infertilidade sejam causados por fatores femininos e que 28% não tenham etiologia estabelecida (Jose-Miller *et al.*, 2007). Diversos fatores podem ser responsáveis por perdas gestacionais, dentre eles: anormalidades uterinas, alterações genéticas; disfunções endócrinas e imunológicas; agentes infecciosos; poluentes ambientais e endometriose. Embora em muitos casos seja possível reconhecer a causa, mais de 50% das perdas gestacionais recorrentes permanecem sem explicação após investigação ginecológica, hormonal e citogenética (Lissalde-Lavigne *et al.*, 2005). Pressupõe-se que os casos de infertilidade sem causa aparente sejam consequência da baixa receptividade endometrial, considerando o endométrio como fator prevaiente na determinação da fertilidade da mulher (Strowitzki *et al.*, 2006). Corroborando essa hipótese, Bernabeu e colaboradores (2005) relataram que, em reprodução assistida, o maior fator limitante para o sucesso da fertilização *in vitro* era a implantação embrionária.

Nas últimas décadas, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de identificar genes e proteínas expressos pelo endométrio e que possam estar relacionados à sua receptividade. Embora no processo implantacional a função individual dessas moléculas não seja totalmente conhecida, os dados resultantes desses estudos forneceram informações complementares, revelando uma complexa via de regulação gênica para que o endométrio

atinja o estado receptivo (Horcajadas *et al.*, 2004; Strowitzki *et al.*, 2006; Horcajadas *et al.*, 2007).

Dentre os genes estudados estão, por exemplo, os que codificam receptores de progesterona e estrógeno, o fator inibidor da leucemia (LIF), moléculas adesivas, como a integrina $\alpha\beta3$; TGF- β (*transforming growth factor- β*), interleucinas, como as IL-1 e IL-6 e metaloproteinases, como as MMP11 e MMP12 (Puri *et al.*, 2000; Popovici *et al.*, 2006).

A expressão diferencial desses genes parece determinar tanto a condição uterina saudável, propícia para a gestação, quanto condições patológicas que variam desde a baixa receptividade endometrial até o desenvolvimento da endometriose.

I. 1. ENDOMETRIOSE

I. 1. 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Endometriose é uma doença ginecológica comum, crônica, benigna, porém agressiva, caracterizada pela presença e crescimento de glândulas e estroma endometrial fora da cavidade uterina, onde é denominado tecido ectópico (Giudice & Kao, 2004; Yang *et al.*, 2004; Sharpe-Timms, 2001).

Os principais sinais clínicos e sintomas da endometriose são dismenorréia (dor pélvica durante a menstruação), dispareunia (dor durante o ato sexual), dor pélvica crônica, irregularidades menstruais e infertilidade (Poliness *et al.*, 2004; Arya & Shaw, 2005; Wu *et al.*, 2005). Outros sintomas podem estar relacionados à doença, como dor durante a ovulação e fadiga crônica (Kenedy *et al.*, 2005). Em aproximadamente 4% dos casos há queixa de disúria, causada pelo envolvimento da bexiga (Hassa *et al.*, 2005), sendo que 3 a 34% das

mulheres afetadas apresentam sintomas relacionados ao trato gastrointestinal (Gustofson *et al.*, 2006). Entretanto, muitas pacientes podem ser assintomáticas (Nap *et al.*, 2004).

O tecido ectópico responde a hormônios e drogas de maneira similar ao endométrio situado no local original, denominado de tecido eutópico. Desta forma, está sujeito às alterações que se manifestam no decurso do ciclo sexual feminino e o sangramento das lesões endometrióticas parece contribuir para desencadeamento de reação imunológica local, inflamação e formação de adesões fibróticas, que podem ser responsáveis pela sintomatologia das pacientes (Arya & Shaw, 2005).

A incidência exata da endometriose é desconhecida e difícil de ser determinada, devido à variabilidade dos sintomas e à definição diagnóstica, que requer abordagem cirúrgica (Prowse *et al.*, 2005). Entretanto, acredita-se que aproximadamente 15% da população feminina em idade reprodutiva seja afetada pela doença, sendo que 30 a 40% das mulheres inférteis apresentam endometriose. Tem sido também identificada como causa de dor pélvica e abdominal em 15 a 32% dos casos submetidos a diagnóstico laparoscópico. Nas pacientes com endometriose que apresentam dor pélvica, infertilidade ou ambas, a frequência é de 35-50% (Hassa *et al.*, 2005; Giudice & Kao, 2004).

Os locais mais frequentes de lesões endometrióticas são o peritônio e os órgãos pélvicos, principalmente ovários, seguidos pelo septo reto-vaginal. Menos de 12% das lesões localizam-se em regiões extra pélvicas, localizadas com maior frequência nos tratos gastrointestinal (sigmóide, reto, área ileocecal e apêndice) e urinário. Raramente pode acometer outras partes do corpo, como pulmões, tórax, pericárdio e cérebro. Sua distribuição é variável, desde poucas regiões afetadas e lesões pequenas até implantes difusos e profundos envolvendo extensas áreas e órgãos pélvicos, além da formação de cistos endometrióticos (endometriomas) e de aderências, as quais causam distorção da anatomia pélvica (Kennedy *et al.*, 2005; Barlow & Kennedy, 2005).

Segundo a *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM, 1997), a endometriose pode ser classificada em quatro estágios (de I a IV), em forma mínima, leve, moderada e severa, conforme a extensão ou tamanho das lesões encontradas. Este método ajuda a avaliar a severidade da doença e quantificar o volume das lesões, além de auxiliar na avaliação da resposta das pacientes ao tratamento (Arya & Shaw, 2005; Kennedy *et al.*, 2005).

Adicionalmente, as lesões endometrióticas do peritônio, ovário e septo reto-vaginal podem ser subdivididas em três tipos distintos, de acordo com a fase de desenvolvimento da doença. As lesões vermelhas são caracterizadas por atividade celular intensa e ampla vascularização, correspondendo aos estágios iniciais da endometriose, quando ocorre implantação ectópica do tecido endometrial. O sangramento deste tecido, seguido de novo crescimento tecidual, desencadeia resposta inflamatória ao redor da lesão, formando uma escara de aparência escura, passando então a ser classificada como lesão negra. A seguir, a fibrose resultante do processo inflamatório e a conseqüente redução de vasos sanguíneos no foco endometriótico deixam-na opaca, com aspecto cicatricial, sendo denominada de lesão branca. Acredita-se que nesta última fase as lesões possam permanecer em estado latente (Nisolle & Donnez, 1997).

A endometriose possui ainda características celulares comuns a neoplasias, como por exemplo proliferação clonal, tendência a metástase e invasão tecidual. Transformações malignas parecem estar associadas a 0,7-1,0% dos casos, sendo 70% deles adenocarcinomas endometrióides. Vários estudos demonstram que as pacientes têm risco aumentado de desenvolver certos tipos de câncer, predominantemente o ovariano, que abrange 76% das ocorrências (Barlow & Kennedy, 2005; Kitajima *et al.*, 2005; Judson *et al.*, 2000; Swiersz, 2001). Contudo, esse risco parece ser extremamente baixo para pacientes jovens, tornando-se maior em períodos próximos à menopausa, tornando, dessa forma, importante o diagnóstico precoce das lesões endometrióticas. Outros sítios de implantação relacionados a processos

malignos são o intestino, bexiga, parede peritoneal, vagina e tubas uterinas (Zanetta *et al.*, 2000; Bergqvist *et al.*, 2004).

Apesar de ser uma das doenças humanas mais frequentes e ser bem caracterizada, sua patogênese permanece pouco conhecida (Redwin, 2002; Bischoff & Simpson, 2004). Segundo revisão de Knapp (1999) com dados históricos sobre a doença, a primeira descrição pelo médico alemão Daniel Shroen data de 1690, já sugerindo ser esta uma doença comum que acometia mulheres sexualmente maduras. Porém, somente em 1927, Sampson caracterizou a endometriose como é conhecida atualmente, elaborando a hipótese etiológica mais aceita. A hipótese, denominada metastática, é de que por meio da menstruação retrógrada fragmentos endometriais, descamados durante a fase menstrual, contendo células viáveis, são transportados através das tubas uterinas até a cavidade peritoneal onde se implantam, crescem e invadem tecidos de órgãos adjacentes (Arya & Shaw, 2005). Algumas evidências sustentam tal hipótese, como a presença de células endometriais viáveis no efluente menstrual e fluido peritoneal, o endométrio ser capaz de se implantar e crescer dentro da cavidade peritoneal e cerca de 70 a 90% das mulheres apresentarem menstruação retrógrada (Guo *et al.*, 2004; Kyama *et al.*, 2003). Dessa maneira, algumas características têm sido consideradas fatores de risco para o desenvolvimento da endometriose, como: ciclos menstruais de curta duração; maior duração da menstruação e menarca precoce, pois aumentam o tempo de exposição às células endometriais (Mounsey *et al.*, 2006).

No entanto, apenas o refluxo não é suficiente para estabelecer a doença, sendo necessárias outras condições que permitam que as células endometriais permaneçam funcionais no local da lesão. Apesar do tecido ectópico ser histologicamente e morfológicamente similar ao eutópico (endométrio situado no local original, ou seja, revestindo a cavidade uterina), eles apresentam diferenças qualitativas ou quantitativas em vários aspectos, como expressão de distintas de moléculas (Gaetje *et al.*, 1995; Sharpe-Timms, 2001). Acredita-se que

determinadas características moleculares favoreçam o aparecimento e a progressão da implantação ectópica, e podem explicar o motivo pelo qual somente algumas mulheres desenvolvem a doença (Viganò *et al.*, 2006).

Estabelecer o diagnóstico da endometriose somente com base na sintomatologia é uma tarefa bastante difícil devido a sua variabilidade, além do que a gravidade da doença nem sempre está relacionada ao quadro clínico. Assim, pode haver um intervalo de anos entre o aparecimento de sintomas e o diagnóstico definitivo (Kennedy *et al.*, 2005). Apesar das imagens de ultra-sonografia e ressonância magnética serem utilizadas como testes diagnósticos, elas são úteis somente para detecção de endometriomas ovarianos e implantes endometrióticos extrapélvicos, respectivamente (Spaczynski & Duleba, 2003; Arya & Shaw, 2005). O procedimento padrão para determinação da localização, estadio, extensão e tipo das lesões é a laparoscopia, mesmo que algumas lesões não sejam reconhecidas devido ao pequeno tamanho ou por estarem atrás de estruturas de adesão (Brosens *et al.*, 2004). Mesmo sendo considerado invasivo, oneroso e com determinado risco para as pacientes, atualmente não existe diagnóstico confiável que não utilize esse método cirúrgico (Spaczynski & Duleba, 2003; Barlow & Kennedy, 2005).

Considerando a dificuldade diagnóstica, muitos estudos têm sido elaborados na tentativa de identificar marcadores séricos para a endometriose (Brosens *et al.*, 2003). Nesse contexto, muitos autores estudaram a correlação entre a doença e os antígenos tumorais CA-125 e CA 19-9, os quais são detectados em maiores quantidades no soro de portadoras, principalmente em estágios mais avançados (Harada *et al.*, 2002). No entanto, apesar destes marcadores terem alta especificidade, ambos possuem baixa sensibilidade, e têm sido utilizados de forma eficaz apenas no monitoramento de pacientes em tratamento (Harada, 2002; de Sá Rosa e Silva, 2006). O tratamento para a doença também é um desafio. Em geral tem com objetivo

eliminar e prevenir o reaparecimento dos implantes endometrióticos, cujos sintomas estão principalmente relacionados a dor e subfertilidade (O'Callaghan, 2006).

Atualmente, o tratamento consiste de drogas como analgésicos, pílulas contraceptivas orais e análogos de GnRH, cirurgia ou ambos (Mounsey *et al.*, 2006). Embora nenhuma terapia tenha se demonstrado eficaz, as lesões são erradicadas com sucesso através de procedimentos cirúrgicos, como eletrocauterização e destruição a laser. Em 47% dos casos há recorrência das lesões (Esfandiari *et al.*, 2007; Marcoux *et al.*, 1997). Em pacientes com endometriose mínima ou média associada a problemas de fertilidade, tanto a retirada das lesões e lise de adesões quanto a inseminação intra-uterina são métodos que aumentam a probabilidade de gravidez (Kennedy *et al.*, 2005; Tummon *et al.*, 1997). Condutas radicais, como a histerectomia, podem ser indicadas para casos mais severos, sendo que a taxa de recorrência nessas pacientes é de 5 a 10% (Arya & Shaw, 2005).

I. 1. 2. ASPECTOS GENÉTICOS DA ENDOMETRIOSE

A origem genética da endometriose foi baseada em estudos familiares, que evidenciaram maior incidência da doença em parentes de primeiro grau de mulheres afetadas, de 4,3 a 6,9%, em relação a parentes de mulheres não afetadas, de 0,6 a 2,0% (Simpson & Bischoff, 2002). No entanto, a grande quantidade de alterações moleculares e celulares detectadas sugere origem poligênica da doença (Hu *et al.*, 2005). Sendo assim, o fenótipo resultante pode decorrer das interações entre produtos da expressão de determinados alelos de genes específicos envolvidos (Barlow & Kennedy, 2005). É verossímil também a idéia de que o ambiente peritonal de mulheres susceptíveis à enfermidade possa favorecer modificações na integridade genômica das células endometriais que provêm do efluente menstrual e, assim, ocasionar o surgimento das lesões (Guo *et al.*, 2004).

Já a associação entre endometriose e câncer está baseada principalmente no conhecimento adquirido por estudos cromossômicos. Regiões com ganho de material possivelmente abrigam oncogenes, enquanto que os genes supressores tumorais encontram-se em regiões de perda cromossômica. As alterações observadas foram descritas em regiões onde há perdas de seqüências de DNA, como nas regiões 1p, 5p, 6q e 22q (Gogusev *et al.*, 2000). Entre os genes com possível desencadeamento de malignidade, estão os supressores tumorais *PTEN* e *TP53* e os proto-oncogenes *Bcl-2* e *c-myc* (Viganó *et al.*, 2006).

I. 1. 3. ASPECTOS MOLECULARES E PATOGÊNESE

Considerando a alta incidência da doença na população feminina, as conseqüências do processo e também a ausência de diagnóstico e tratamento efetivos, grande esforço científico tem sido direcionado para pesquisas sobre a doença. Vários estudos na literatura evidenciam que as principais divergências moleculares entre portadoras e não portadoras de endometriose estão relacionadas a processos envolvidos na apoptose (Braun *et al.*, 2002), adesão celular (Béliard *et al.*, 1997), angiogênese (Healy *et al.*, 1998), biosíntese de estrógeno (Zeitoun & Bulun, 1999), sistema imune, além de fatores de crescimento (Braun & Dmowski, 1998) e metaloproteinases (Martelli *et al.*, 1993).

Dessa forma, uma sequência determinada de eventos faz-se necessária para o estabelecimento das lesões. Primeiramente, as células endometriais devem ter maior capacidade para estabelecer interações célula-célula e entre células e matriz extracelular nos locais onde se implantam. O fato de que o tecido endometriótico é capaz de expressar diferentes integrinas pode explicar a habilidade desse tecido em aderir ao peritônio, uma vez que essas moléculas servem como receptoras de laminina, fibronectina, colágeno tipo I e IV e vitronectina. (Regidor *et al.*, 1998). A expressão aumentada de moléculas de adesão, como

ICAM-1, em mulheres acometidas pela endometriose também auxilia na elucidação desse fenômeno (Matalliotakis *et al.*, 2001).

Após a fixação, as células que formam a lesão têm que ser hábeis para invadir o tecido ao qual se ligaram. Logo, o aumento da expressão de metaloproteinases, como MMP-2, e a expressão reduzida de seus inibidores, como TIMP-3, sugerem maior atividade proteolítica e conseqüentemente maior potencial invasivo de células endometriais em pacientes com endometriose (Chung *et al.*, 2002; Cox *et al.*, 2001).

Para sustentação das lesões endometrióticas, a neovascularização é um processo importante e comumente observado ao redor delas. Atividade e quantidade aumentadas de fatores angiogênicos no fluido peritonal de pacientes têm sido descritas na literatura, sendo VEGF, a principal molécula envolvida, expressa nos implantes endometrióticos (Donnez *et al.*, 1998; Viganó *et al.*, 2004).

Como a endometriose é uma doença estrógeno dependente, a síntese desse hormônio auxilia a manutenção dos implantes ectópicos. Em 1999, Zeitoun e Bulun observaram alta síntese de aromatase em cistos endometrióticos e implantes endometriais extra-ovarianos. Considerando que a aromatase cataliza a biosíntese de estrógeno, os autores sugeriram que essa expressão aberrante está relacionada à patogênese da doença.

O desenvolvimento da doença também depende da proliferação da lesão estabelecida, a qual é mais alta nas células epiteliais, estromais e endoteliais do endométrio de mulheres portadoras (Wingfield *et al.*, 1995). Exemplos de fatores que intensificam o crescimento celular incluem FGF, EGF, TGF- α , TGF- β e TNF- α (Hammond *et al.*, 1993).

Outro fenômeno que ajuda a explicar a persistência das lesões endometrióticas fora da cavidade uterina é a resistência à apoptose, devido à desregulação entre moléculas pró-apoptóticas menos expressas, como por exemplo a p53, e moléculas anti-apoptóticas, como Bcl-2, mais expressas (Braun *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 1998).

Em relação à imunologia da endometriose, foi sugerido que as células dos implantes ectópicos apresentam mecanismos de escape, quer seja pela modificação da expressão de antígenos, como HLA classe I, que impedem o reconhecimento imunológico, ou pela secreção de TGF- β e prostaglandina E2, que inibem a função linfocitária, quer seja pelo comprometimento da atividade das células *natural killer*, levando à redução da vigilância imunológica. Além disso, foi descrito um aumento no número de macrófagos ativos no fluido peritonal das pacientes, os quais secretam citocinas, como IL-8 e TNF- α , promovendo proliferação celular, adesão e angiogênese (Semino *et al.*, 1995; Oosterlynck *et al.*, 1991).

Adicionalmente, as alterações secundárias ou conseqüentes à endometriose também têm sido estudadas em nível molecular. Quanto à infertilidade, considera-se que a causa principal de baixas taxas de gravidez em pacientes afetadas pela doença está relacionada a anormalidades na expressão de moléculas endometriais, resultando em falhas na implantação embrionária (Kao *et al.*, 2003). Essa consideração apóia-se no fato de que a expressão da integrina $\alpha V\beta 3$, importante durante o período de receptividade uterina ao embrião, está ausente no endométrio tópico das mulheres afetadas pela patologia (Vernet-Tomás *et al.*, 2006), além do que os altos níveis de óxido nítrico endotelial encontrados nessas mulheres podem ser responsáveis por efeitos citotóxicos, que tornam o útero menos receptivo ao embrião (Khorram & Lessey, 2002). Outras investigações revelaram que o fluido peritonal de mulheres com endometriose pode ser tóxico aos espermatozóides e exibe efeito adverso à sobrevivência embrionária, pois quando inoculado em coelhos, ratos e hamsters, reduzia as taxas de implantação embrionária nesses animais (Giudice *et al.*, 2002). Além disso, os produtos secretados pelo endométrio ectópico e/ou por células imunológicas contêm substâncias com efeito prejudicial à fertilidade (como citocinas, fatores de crescimento, prostaglandinas, espécies reativas de oxigênio e auto-anticorpos) que interferem na ovulação, função endócrina, transporte de gametas e do embrião, fertilização e desenvolvimento

embrionário, aumentando assim a possibilidade de falhas de implantação do embrião (Dmowski *et al.*, 2002).

I. 2. METODOLOGIA DE INVESTIGAÇÃO MOLECULAR

Na última década, muitos estudos foram realizados na área de genética molecular com objetivo de explorar o genoma dessas pacientes, visando a identificação de genes candidatos a marcadores da endometriose (Taylor *et al.*, 2002). Alguns autores tentaram associar a doença a polimorfismos genéticos, relacionados, por exemplo, com os genes *GALT*, *CYP1A1*, *NAT2* e *GMST1*. Esses estudos, no entanto, apresentaram resultados controversos (Bischoff & Simpson, 2004).

Atualmente, as pesquisas buscam a investigação de genes que se expressem diferencialmente (maior ou menor expressão) nas células que correspondem às lesões endometrióticas. Para isso, várias metodologias foram aplicadas para *screening* desses genes, dentre elas as principais são *microarrays*, hibridação genômica comparativa e biblioteca subtrativa (Gogusev *et al.*, 1999; Gogusev *et al.*, 2000; Kao *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2006). Alguns autores buscaram esclarecer se existe diferença de expressão gênica entre os tecidos eutópico e ectópico das mesmas pacientes. Com isso, puderam avaliar quais genes influenciavam modificações nas células endometriais do útero, tornando-as capazes de se implantar em locais e órgãos distintos.

A hibridação subtrativa é uma metodologia que compara dois grupos celulares distintos denominados *tester* e *driver*, permitindo isolar genes mais expressos em somente um dos dois grupos, pois remove seqüências comuns entre eles (Cho & Park, 1998; Taylor *et al.*, 2002). Segundo Jiang e colaboradores em 2000, a técnica de hibridação subtrativa rápida (*RaSH*) simplifica e torna mais eficiente o processo de subtração, identificando grande

quantidade de seqüências diferencialmente expressas, o que inclui genes conhecidos, além de seqüências ainda não descritas nos bancos de dados atuais. Resumidamente, o protocolo de *RaSH* é baseado na digestão enzimática dos cDNAs das amostras dos dois grupos a serem testados e os fragmentos gerados são ligados a adaptadores e amplificados por PCR. Após esses passos, somente as amostras de um dos grupos (*tester*) são digeridos novamente, com a enzima de restrição *XhoI*. Posteriormente as seqüências de ambos os grupos são incubadas juntamente para que ocorra hibridação. Nesta etapa, as amostras do grupo denominado *driver* são colocadas em excesso na reação, o que garante a subtração. O resultado do processo são moléculas representadas por 3 tipos de cDNA fita dupla: *driver-driver*, *driver-tester* e *tester-tester*. Somente a população de moléculas *tester-tester* é selecionada após ligação a plasmídeos previamente tratados com a enzima *XhoI*. Então os plasmídeos recombinantes são inseridos por transformação bacteriana, e as bactérias plaqueadas em meio de cultura. Finalmente os insertos são retirados das colônias e seqüenciados.

Em 2002, Eyster e colaboradores empregaram a tecnologia de cDNA *microarrays* comparando os níveis de expressão gênica em três pacientes, numa plataforma com 4133 genes. Oito deles foram considerados super-expressos nos implantes ectópicos, alguns responsáveis por componentes do citoesqueleto (como vimentina) e os demais com funções relacionadas ao sistema imune. Com o mesmo intuito, Hu, Tay & Zhao, em 2005, utilizaram hibridação subtrativa de cDNA em 15 pacientes com a doença. Neste trabalho obtiveram 78 cDNAs diferentes, entre os quais 14 genes foram classificados como possíveis candidatos a marcadores da doença. Entre os genes mais expressos nas lesões estavam o *IGFBP5*, relacionado ao crescimento das lesões e *PSAP* e *FBLN1*, associados a câncer ovariano e de mama. Entre os menos expressos, estavam os genes *RhoE*, ligado a adesão celular, *DLX5*, que auxilia na persistência do estado proliferativo das células endometrióticas e *11 β -HSD2*,

responsável por estimular atividade da aromatase, atuando assim como mantenedor das lesões em local ectópico.

Após terem evidenciado que o endométrio eutópico das pacientes com endometriose possuía propriedades intrínsecas que provocavam seu desenvolvimento em lesões endometrióticas (Gagné *et al.*, 2003), pesquisadores procuraram estudar a expressão gênica diferencial do endométrio de mulheres portadoras e não portadoras de endometriose, para identificar possíveis genes de susceptibilidade à doença. Flores e colaboradores, em 2006, aplicaram amostras de cDNA, obtidas a partir de RNA de linfócitos de sangue periférico dos dois grupos estudados, em *arrays* contendo 14185 seqüências de genes conhecidos. Os resultados incluíram genes envolvidos no metabolismo de colágeno, promoção da proliferação celular e tumorigênese, mas diferenças de expressão mais significativas foram relacionadas aos genes *IL2RG* e *LOXL1*, ligados ao sistema imunológico e supressão tumoral, respectivamente. Também em 2006, Kyama e colaboradores aplicaram a técnica de PCR em tempo real para avaliar a expressão de mRNAs de citocinas, metaloproteases, fatores de crescimento e de adesão em biópsias endometriais e peritônio de mulheres com e sem a doença. Foi detectado aumento da expressão de moléculas de mRNA referentes aos genes *TNF- α* , *IL-8* e *MMP-3*, principalmente na fase menstrual do ciclo sexual feminino. Esse resultado significa maior capacidade do tecido endometrial das pacientes em proliferar, aderir e formar vasos sanguíneos, promovendo o implante ectópico e o desenvolvimento das lesões endometrióticas. Os autores sugeriram que a progressão da doença, bem como seu estadiamento, podiam ser preditas de acordo com o nível de expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e MMPs.

Em 2003, Kao e colaboradores usaram *microarrays* para pesquisa de genes associados a falhas de implantação embrionária e infertilidade, utilizando amostra de tecido endometrial de oito afetadas e 12 mulheres sem a doença. Os resultados sugeriram que a maior expressão dos

genes *B61* e semaforina E, participantes do processo de neovascularização, determinaria o estabelecimento das lesões. Além disso, foi postulado que a desregulação de outros genes, como *BSEP*, *C4BP*, glicodelina, *IL-15* e pentaxina II, provocaria respostas inflamatórias, disfunção do sistema imune, toxicidade embrionária e apoptose, produzindo ambiente uterino inóspito para o início da gravidez. Simultaneamente, a alteração da expressão de *GlcNAc6ST* poderia bloquear mecanismos de adesão endometrial, resultando em falha implantacional.

Apesar da extensa investigação molecular descrita por diferentes grupos de pesquisa, ainda não há consenso sobre quais genes e seus produtos são responsáveis pelo surgimento e progressão da endometriose, assim como quais moléculas podem ser consideradas marcadoras para diagnóstico e terapêutica.

I. 3. JUSTIFICATIVA

Apesar da extensa literatura sobre a determinação da origem da endometriose, sua etiologia permanece desconhecida. Devido à alta frequência da doença em mulheres em idade reprodutiva, principalmente em pacientes inférteis, e aos métodos invasivos utilizados para seu diagnóstico, torna-se importante a busca de novas metodologias de investigação. Este projeto busca identificar genes envolvidos na fisiopatologia da endometriose, com objetivo de determinar possíveis marcadores moleculares para diagnóstico e tratamento da doença.

II. OBJETIVOS

O objetivo principal do trabalho foi identificar por meio da técnica de *RaSH (Rapid Subtraction Hybridization)*, genes com expressão diferencial em lesões endometrióticas e em tecido endometrial de mulheres não afetadas.

Os objetivos intermediários foram:

- (1) identificar genes com maior ou menor expressão em lesões endometrióticas de pacientes com diagnóstico firmado de endometriose;
- (2) identificar genes com maior ou menor expressão em endométrio de mulheres não afetadas pela doença, para análise comparativa;
- (3) correlacionar os genes expressos diferencialmente com os processos fisiopatológicos relacionados à endometriose.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética Molecular Humana do bloco C do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), com apoio de equipe multidisciplinar da área de Genética Reprodutiva, em colaboração com o serviço de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática da Fundação Hemocentro da mesma instituição e do Laboratório de Oncologia Pediátrica do Departamento de Pediatria e Puericultura da FMRP-USP. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCFMRP-USP, processo HCRP nº 11736/2004. Todas as pacientes participantes da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

III. 1. AMOSTRAS

Para realização deste projeto, foram coletadas 22 amostras de tecido endometrial de pacientes atendidas em ambulatórios especializados do HCFMRP-USP, divididas em dois grupos.

O grupo I compreende 11 biópsias de lesões endometrióticas, sendo cinco de origem ovariana e seis de origem peritonal, de pacientes encaminhadas aos Ambulatórios de Dor Pélvica e Endoscopia (AGDE) e de Infertilidade Conjugal do HCFMRP-USP, diagnosticadas com endometriose por meio de exame laparoscópico, confirmado por análise histológica.

O grupo II (grupo controle) compreende 11 amostras de endométrio tóxico, sendo as biópsias obtidas utilizando cureta de Novak, de pacientes sem diagnóstico de endometriose,

após serem submetidas à laparoscopia, encaminhadas pelo Ambulatório de Planejamento Familiar para laqueadura tubária.

As amostras foram coletadas no centro cirúrgico do HCFMRP-USP e armazenadas em freezer -80°C após tratamento com criopreservador *Tissue-Tek® O.C.T. Compound* (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA).

O estadio da doença foi determinado de acordo com a classificação da *American Society for Reproductive Medicine* (Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996). Os critérios de inclusão foram amostras de pacientes com idade entre 18 e 40 anos, apresentando ciclos menstruais regulares de 25 a 35 dias, que estivessem na fase proliferativa do ciclo menstrual e sem uso de anticoncepcional oral ou qualquer outra forma de tratamento hormonal no período de três meses anterior à coleta.

III. 2. METODOLOGIA

III. 2. 1. ISOLAMENTO DO RNA TOTAL

Anteriormente à extração de RNA, eliminamos o criopreservador lavando os tecidos com 1mL de PBS (NaCl 8,50g/L; Na₂HPO₄ 1,11g/L; Na₂HPO₄.12H₂O 2,81g/L; KH₂PO₄ 0,20g/L pH7,0) por três vezes.

As amostras foram maceradas completamente com nitrogênio líquido e para cada 50mg de tecido adicionamos 1mL de TRIZOL[®] Reagent (*Invitrogen Life Technologies, USA – Molecular Research Center, Inc.*) até atingir consistência líquida. O RNA total de cada amostra de tecido foi isolado adicionando 200µL de clorofórmio, seguido de centrifugação, de acordo com as recomendações do fabricante. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo

e o RNA foi então precipitado com 500µL de álcool isopropílico. O *pellet* foi lavado com 1mL de etanol 75% e, após secagem, diluído em 12µL de água tratada com DEPC.

A integridade do RNA foi analisada em gel de agarose 1%, marcado com brometo de etídeo e visualizada com luz ultra-violeta. A verificação de bandas de RNAs ribossômicos de 28S e 18S intactos foram usadas como critério para certificação de que os RNAs não estavam degradados. As concentrações das soluções de RNA foram medidas em espectrofotômetro (Eppendorf) a DO_{260} , depois de diluídas individualmente em 10µL de água livre de RNase. O RNA permaneceu armazenado à -80°C até o momento do uso.

III. 2. 2. *RAPID SUBTRACTION HYBRIDIZATION (RaSH)*

No presente trabalho, aplicamos o protocolo de *RaSH* (Jiang *et al.*, 2000) com modificações, utilizando RNA extraído de lesões endometrióticas e de endométrio tópico de mulheres não afetadas pela endometriose. O protocolo foi executado duas vezes, sendo que ambos os grupos serviram uma vez como *tester* e outra como *driver*.

Esquema ilustrativo da técnica de *Rash*:

Figura 1: A) Amostras de cDNAs obtidos a partir dos tecidos analisados, transcrição reversa, restrição enzimática com MboI e ligação dos adaptadores; B) PCR com *primers* XDPN-18 e restrição enzimática somente da amostra *tester*, representada, na figura, pela lesão endometriótica; C) Mistura das amostras *tester* e *driver*, seguida de reação de hibridação; D) Representação dos híbridos gerados, ligação do híbrido *tester-tester* ao plamídeo tratado com a enzima de restrição XhoI, transformação bacteriana, plaqueamento e sequenciamento dos insertos clonados.

III.2.2.1. SÍNTESE DE cDNA

Para síntese de cDNA, foram escolhidas aleatoriamente seis amostras do grupo controle e seis amostras de mulheres com endometriose. As amostras foram separadas de acordo com o grupo ao qual pertenciam e misturadas, gerando dois conjuntos ou *pools* com 25µg de RNA total. Cada amostra contribuiu com a mesma quantidade de RNA (4,17µg).

Obtivemos os cDNAs fita dupla utilizando 200U da enzima *SuperScriptTM II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) e 0,50µg de oligo(dT)₁₂₋₁₈, para síntese da primeira fita, além de 10U de *E. coli* DNA ligase (Invitrogen) e 40U de *E. coli* DNA Polymerase I (Invitrogen), para síntese da segunda fita. Logo após, a qualidade da síntese do cDNA foi avaliada pela técnica de PCR, usando *primers* para β -actina.

III.2.2.2. DIGESTÃO ENZIMÁTICA E LIGAÇÃO DOS ADAPTADORES

Os cDNAs foram incubados com 20U da enzima de restrição MboI por 1 hora a 37⁰C para digestão. Os fragmentos produzidos foram extraídos com fenol/clorofórmio e precipitados com etanol. Os sítios gerados nas extremidades dos fragmentos foram ligados aos adaptadores XDPN-12 (GATCTCTCGAGT) e XDPN-14 (CTGATCACTCGAGA), usando 8,0µL de tampão ligase 5X. Acrescentamos 9U de T4 ligase (Invitrogen) e em seguida incubamos a 14⁰C *overnight*, para efetuar a reação de ligação.

III.2.2.3. PCR E PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS

As amostras obtidas da reação anterior foram diluídas com LoTE (Invitrogen), em volume final de 100µL e amplificadas por PCR, contendo 6,00µL do *primer* XDPN-18 (CTGATCACTCGAGAGATC), complementar aos adaptadores. Após a PCR, os produtos foram misturados de acordo com o grupo ao qual pertenciam (grupo I e grupo II). Foi

realizada extração por fenol/clorofórmio e precipitação com etanol para obtenção dos produtos da amplificação.

III.2.2.4. DIGESTÃO DO *TESTER* E HIBRIDAÇÃO SUBTRATIVA

Dez microgramas da amostra *tester* foram digeridos com 20U da enzima de restrição XhoI (Gibco BRL). Os fragmentos obtidos foram então diluídos em 30µL de LoTE. Cem nanogramas do produto da digestão foram misturados a 5µg da amostra *driver*. A reação de hibridação foi realizada adicionando à mistura 16,60µl de tampão de ligação (0,5M de NaCl; 50mM de Tris/HCl; SDS 0,2%; formamida 40%) e após denaturação a 100⁰C durante 5 minutos, a solução foi incubada a 42⁰C por 48 horas.

Então foram aplicados 3µl do produto da hibridação à solução contendo 0,50µl do plasmídeo pZER[®]O⁻1 (1µg/µL) pré-digerido com a enzima de restrição XhoI. A mistura foi incubada a 16⁰C durante 3 horas para ligação do híbrido *tester-tester* com o plasmídeo.

III.2.2.5. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA E GERAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE cDNA

Dois microlitros do plasmídeo recombinante foram adicionados a 50µl de solução contendo bactérias competentes, seguido de eletroporação (2,5 V, 25 µFD, 200 OHMS) (*GenePulser*, BioRad). Acrescentamos 500µl de meio líquido SOC à mistura, a qual foi mantida em *shaker* à rotação de 200 RPM, por 1 hora, a 37⁰C.

Após incubação, adicionamos mais 500µl de meio SOC e semeamos a solução em placas de Petri contendo 40mL de meio ágar *LB Low Salt* com 20µl do antibiótico zeocina (100mg/mL). Seguiu-se incubação em estufa a 37°C, *overnight*.

III.2.2.6. ANÁLISE DAS COLÔNIAS E OBTENÇÃO DOS DADOS

As colônias foram palitadas e semeadas em microplacas de 96 poços. Cada poço continha 150µl do meio líquido 2XYT com zeocina (50mg/mL). Após incubação a 37°C *overnight*, uma alíquota de 1µl de cada poço foi usada para PCR, com *primers* M13, complementares a seqüências internas do plasmídeo, flanqueado aos insertos de cDNA *tester-tester*. Os produtos das reações foram visualizados em gel de agarose 1,5% e seqüenciados em seqüenciador automático MegaBace™ 1000 (*Amesham Biosciences, Piscataway, NJ, USA*) utilizando *DYEnamic ET Dye Terminator Sequencing Kit* (*Amesham*

Biosciences, Piscataway, NJ, USA), segundo as normas do fornecedor.

As seqüências obtidas foram analisadas e armazenadas no banco de dados do Laboratório de Genética Molecular e BioInformática da Fundação Hemocentro do HCFMRP-USP para posterior análise com o programa *Generic EST Annotation Pipeline* (*Geap*), desenvolvido no mesmo laboratório, o qual utiliza os seguintes valores padrões: *phred cutoff* de 0,09, valor de qualidade 100pb, *minmatch* 10, *minscore* 20 e *BLAST* ($1e^{-30}$).

Foram selecionadas para composição do banco de dados, as seqüências que tiveram, no mínimo, 90% de homologia com as depositadas no banco de dados *GenBank*[®] do *National Institute of Health* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

Após a geração desses dados, procedeu-se a leitura de informações sobre os genes, aos quais as seqüências obtidas pela *RaSH* se referem, através de buscas nos *sites* de acesso público *Gene Ontology* (<http://fatigo.bioinfo.cnio.es>) e, principalmente, no *National Center for Biotechnology Information - NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os textos analisados pelo *site* da *NCBI* são encontrados através dos *links*:

- *GENE*: banco de dados para pesquisa de informações de genes específicos. O conteúdo é atualizado constantemente, envolvendo nomenclatura, localização cromossômica, produtos gênicos, fenótipos associados e *links* para citações, seqüências homólogas, expressão, domínios protéicos e bancos de dados externos;
- *OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)*: banco de dados que abrange genes humanos e doenças genéticas. As informações fornecidas por vários *sites* de armazenamento de dados envolvem textos e referências bibliográficas;
- *PubMed*: banco de dados desenvolvido na [National Library of Medicine \(NLM\)](#) que fornece mais de 14 milhões de artigos científicos publicados em mais de 4800 jornais e revistas especializadas em diversas áreas, principalmente a biomédica.

Para facilitar a seleção dos genes de interesse, o grupo de Bioinformática do bloco G do Depto. de Genética da FMRP-USP elaborou um programa capaz de cruzar palavras dos textos com as principais palavras-chave de eventos biológicos, fisiológicos e/ou patológicos que poderiam estar envolvidos nas principais causas do estabelecimento e desenvolvimento da endometriose. Após revisão da literatura, foi elaborada uma lista dos principais termos provavelmente associados à patogênese da doença. As palavras utilizadas foram: “*blood supply*”; “*cell;cycle*”; “*celldeath*”; “*programmed cell death*”; *adherence*; *adhesion*; *adhesions*; *angiogenesis*; *angiogenetic*; *antiangiogenic*; *antiapoptosis*; *apoptosis*; *attach*; *attached*; *attaches*; *attachment*; *autoimmune*; *cancer*; *cancers*; *carcinogenesis*; *carcinoma*; *chemoattractant*; *chemokin*; *chemokines*; *chemotactic*; *cyst*; *cysts*; *cytokine*; *cytokines*; *differentiate*; *differentiates*; *differentiation*; *dissemination*; *endometrioma*; *endometriomas*; *endometriosis*; *endometriotic*; *endothelial*; *endothelium*; *estrogen*; *female*; *fertile*; *fertility*; *fertilization*; *gonad*; *gonadal*; *gonads*; *grow*; *growth*; *gynecologic*; *gynecology*; *hyperplasia*; *hyperplasic*; *immune*; *immunologic*; *immunological*; *immunology*; *immunosuppression*; *immunosuppressive*; *implant*; *implantation*; *implants*; *infertile*; *infertility*; *inflammation*;

inflammatory; interleukin; invade; invading; invasion; lesion; lymphocyte; lymphocytes; lymphoma; malignancies; malignancy; malignant; menstrual; menstruation; metaplasia; metaplastic; metastasis; mitogen; mitogenic; mitosis; neoangiogenesis; neoplasia; neoplasm; neoplastic; oestrogen; oncogenesis; oncogenic; ovarian; ovaries; ovary; ovulation; pelvic; pelvis; peritonal; peritoneum; pregnancy; pregnant; proapoptotic; proinflammatory; proliferate; proliferates; proliferation; proliferative; prostaglandins; reproduction; reproductive; scatter; spread; spreading; spreads; steroid; steroids; survival; survive; tumor; tumoral; tumorigenesis; tumors; tumour; tumours; uterine; uterus; vasculature; woman; women.

Depois de executado o programa, as seqüências obtidas pela *RaSH* foram classificadas em:

- Candidatas – seqüências referentes a genes que participavam de processos que poderiam estar relacionados à endometriose;
- Não-candidatas - seqüências referentes a genes que participavam de processos que não estavam relacionados à endometriose;
- Com informações insuficientes - seqüências referentes a genes cujas informações da literatura eram escassas e portanto sem relação direta com a endometriose;
- Com dados controversos na literatura - seqüências referentes a genes cuja ação ou função ainda não estão bem estabelecidas.

III. 2. 3. VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES SELECIONADOS POR RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

III.2.3.1. SÍNTESE DE cDNA

Para obtenção do cDNA, usamos o *High Capacity cDNA Reversion Transcription Kit* (*Applied Biosystems*), segundo instruções do fabricante. Um micrograma de cada amostra de RNA total foi adicionado a tampão 10X, dNTP 100mM, *random primer* 10X, 1,25µL da enzima *multiscribe* e 2,5U de RNaseOUT™ (*Invitrogen*) em volume final de 25µL. A solução foi submetida a 25°C por 10 minutos, seguido de 37°C por 2 horas e 85°C por 5 segundos. Então cada amostra foi diluída em água DEPC na proporção 1 para 50. Os produtos das reações foram armazenados em *freezer* -20°C até a realização da técnica de RT-PCR quantitativo em tempo real.

III.2.3.2. EFICIÊNCIA DA REAÇÃO

Para todos os genes de interesse (*SPARC*, *SSAT*, *HTRA1* e *LOXLI*) e controle endógeno (*GAPDH*) foram construídas curvas de amplificação a partir da utilização de diluições seriadas (não diluído, 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³) em triplicata do cDNA da amostra calibradora. Utilizamos como calibrador uma amostra de cDNA obtida a partir de RNA do tecido endometrial normal de uma paciente sem endometriose. Para construção da curva-padrão, foram usados pelo menos três pontos a partir da curva de amplificação. Consideramos as curvas com *slope* entre -3,55 e -3,1, o que reflete eficiência de amplificação de, no mínimo,

90,5%. As figuras 2 e 3 mostram, respectivamente, a curva de amplificação e curva-padrão construídas para o gene *LOXL1*.

Figura 2: Curva de amplificação do gene *LOXL1*. Foi plotada a fluorescência da amplificação versus o número de ciclos da PCR.

Fonte: ABI PRISM™ 7500 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems)

Figura 3: Curva-padrão do gene *LOXLI* obtida a partir da curva de amplificação.

Fonte: ABI PRISM™ 7500 *Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems)

III.2.3.3. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A quantificação da expressão gênica foi realizada por meio da RT-PCR quantitativa em tempo real no aparelho ABI PRISM™ 7500 *Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems) do Laboratório de Oncologia Pediátrica do Departamento de Puericultura e Pediatria do HCFMRP-USP. As reações foram executadas utilizando o sistema TaqMan® (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Cada reação continha *Universal PCR Master Mix 2X*, *Gene Expression Assay Mix 20X* e 9µL de cDNA em volume final de 20µL. As condições da reação foram 95°C por 10 minutos, seguidos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, durante 40 ciclos.

As expressões dos genes de interesse foram calculadas de acordo com a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, de acordo com o trabalho de Livak & Schmittgen (2001), fornecendo os valores de RQ (*Relative Quantification*), os quais foram utilizados na análise estatística.

III. 2. 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação dos dados de expressão gênica foi realizada pelo teste não-paramétrico de soma de postos de Wilcoxon, para duas amostras independentes com nível de confiança de 95%, utilizando o programa *STATDISK 9.1* (Triola, 2005).

Para os genes com diferença significativa no teste anterior, os valores dos níveis de expressão gênica também foram avaliados a partir da análise da curva ROC (*Receiver-Operating Characteristic*), através do *software* MedCalc (<http://www.medcalc.be>). A curva refere-se a valores de verdadeiros positivos (sensibilidade, verdadeiros-positivos / falsos-

negativos + verdadeiros-positivos) em função dos falsos positivos (especificidade, verdadeiros-negativos / falsos-positivos + verdadeiros-negativos). A área abaixo da curva é a medida de quanto é acurada a distinção entre os grupos analisados (Metz, 1978; Zweig & Campbell, 1993). Adicionalmente, a partir da curva ROC foi gerado, pelo mesmo programa, o diagrama de pontos interativos (*interactive dot*) para estudo da precisão da separação dos grupos desse estudo. O diagrama indica o valor de RQ que permite melhor separação (mínimo de falsos-positivos e de falsos-negativos) entre os grupos.

IV. RESULTADOS

IV.1. OBTIDOS PELA TÉCNICA DE *RaSH*

Os dados referentes às seqüências que seguiram os critérios de seleção permaneceram disponíveis aos pesquisadores deste trabalho no site <http://guarani.fmrp.usp.br/geap>.

As seqüências analisadas das bibliotecas de cDNA foram divididas em 8 categorias: mitocondrial; levedura; RefSeq (seqüências de referência) ; UniGene; outros; ribossômica; ESTs e bactéria.

A tabela I sumariza os resultados referentes às seqüências de referência: a coluna RHENDI apresenta os dados obtidos quando o conjunto de cDNAs do grupo de mulheres com endometriose foi utilizado como *tester* e a coluna RHENDW é referente aos resultados obtidos quando esse mesmo conjunto de cDNAs foi usado como *driver*. Os números à direita correspondem à quantidade de colônias contendo os insertos referentes às seqüências anotadas à esquerda. As demais categorias de seqüências estão relacionadas nos anexos A e B.

Tabela I: Seqüências de referência obtidas pela RaSH nas bibliotecas RHENDI e RHENDW

RefSeq		RHENDI	RHENDW
NM_013349	Homo sapiens SCIRP10-related protein (SCIRP10), mRNA		1
NM_001001894	Homo sapiens tetratricopeptide repeat domain 3 (TTC3), transcript variant 2, mRNA		4
NM_001008897	Homo sapiens t-complex 1 (TCP1), transcript variant 2, mRNA		1
			continua

continuação

NM_000291	Homo sapiens phosphoglycerate kinase 1 (PGK1), mRNA	1
NM_153000	Homo sapiens adenomatosis polyposis coli down-regulated 1 (APCDD1), mRNA	1
NM_002668	Homo sapiens proteolipid protein 2 (colonic epithelium-enriched) (PLP2), mRNA	1
NM_006732	Homo sapiens FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B (FOSB), mRNA	3
NM_000518	Homo sapiens hemoglobin, beta (HBB), mRNA	3
NM_001961	Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2), mRNA	2
NM_003118	Homo sapiens secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin) (SPARC), mRNA	7
NM_004530	Homo sapiens matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase) (MMP2), mRNA	2
NM_001780	Homo sapiens CD63 antigen (melanoma 1 antigen) (CD63), mRNA	12

continua

continuação

XM_929146	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC646190 1 (LOC646190), mRNA	
NM_002568	Homo sapiens poly(A) binding protein, cytoplasmic 1 (PABPC1), mRNA	1
XM_496985	PREDICTED: Homo sapiens similar to transcription elongation factor B polypeptide 3 binding protein 1 1 (LOC441363), mRNA	
NM_000918	Homo sapiens procollagen-proline, 2- oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4- hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase-associated 1) (P4HB), mRNA	1
NM_207521	Homo sapiens reticulon 4 (RTN4), transcript variant 5, mRNA	3
NM_013974	Homo sapiens dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 (DDAH2), mRNA	5
NM_198976	Homo sapiens TH1-like (Drosophila) (TH1L), transcript variant 1, mRNA	1
NM_014300	Homo sapiens SEC11-like 1 (S. cerevisiae) (SEC11L1), mRNA	1

continua

continuação

NM_001013702	Homo sapiens similar to p40 (LOC440258), mRNA	12	1
NM_006367	Homo sapiens CAP, adenylate cyclase- associated protein 1 (yeast) (CAP1), mRNA		1
NM_017733	Homo sapiens GPI7 protein (GPI7), mRNA		1
NM_004109	Homo sapiens ferredoxin 1 (FDX1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA		1
NM_024293	Homo sapiens chromosome 2 open reading frame 17 (C2orf17), mRNA		1
NM_004786	Homo sapiens thioredoxin-like 1 (TXNL1), mRNA		1
NM_145702	Homo sapiens tigger transposable element derived 1 (TIGD1), mRNA	1	
NM_203392	Homo sapiens family with sequence similarity 27-like (FAM27L), mRNA	1	
NM_002775	Homo sapiens protease, serine, 11 (IGF binding) (PRSS11), mRNA		1
NM_052996	Homo sapiens PR domain containing 7 (PRDM7), mRNA	1	

continua

continuação

NM_003017	Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 3 (SFRS3), mRNA	1
NM_021141	Homo sapiens X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining; Ku autoantigen, 80kDa) (XRCC5), mRNA	2
XM_926493	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC643121 (LOC643121), mRNA	1
NM_005575	Homo sapiens leucyl/cystinyl aminopeptidase (LNPEP), transcript variant 1, mRNA	2
NM_005016	Homo sapiens poly(rC) binding protein 2 (PCBP2), transcript variant 1, mRNA	3
NM_003155	Homo sapiens stanniocalcin 1 (STC1), mRNA	1
NM_016015	Homo sapiens leucine carboxyl methyltransferase 1 (LCMT1), mRNA	1
NM_006476	Homo sapiens ATP synthase, H ⁺ -transporting, mitochondrial F0 complex, subunit g (ATP5L), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA	2

continua

continuação

NM_015917	Homo sapiens glutathione S-transferase kappa 1 (GSTK1), mRNA	1
NM_003079	Homo sapiens SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1 (SMARCE1), mRNA	1
NM_005801	Homo sapiens putative translation initiation factor (SUI1), mRNA	2
NM_001001522	Homo sapiens transgelin (TAGLN), transcript variant 1, mRNA	1
XM_938374	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC648101, transcript variant 1 (LOC648102), mRNA	1
NM_032376	Homo sapiens hypothetical protein MGC4251 (MGC4251), mRNA	2
NM_000801	Homo sapiens FK506 binding protein 1A, 12kDa (FKBP1A), transcript variant 12B, mRNA	1
XM_498789	PREDICTED: Homo sapiens LOC440645 (LOC440645), mRNA	4

continua

continuação

NM_006098	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1 (GNB2L1), mRNA	11
NM_000198	Homo sapiens hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid 1 delta-isomerase 2 (HSD3B2), mRNA	
NM_014380	Homo sapiens nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1 (NGFRAP1), transcript variant 3, mRNA	1
NM_201428	Homo sapiens reticulon 3 (RTN3), transcript variant 2, mRNA	1
NM_005097	Homo sapiens leucine-rich, glioma inactivated 1 (LGI1), mRNA	1
NM_017794	Homo sapiens KIAA1797 (KIAA1797), mRNA	1
NM_198252	Homo sapiens gelsolin (amyloidosis, Finnish type) (GSN), transcript variant 2, mRNA	1
NM_006472	Homo sapiens thioredoxin interacting protein (TXNIP), mRNA	1

continua

continuação

NM_002778	Homo sapiens prosaposin (variant Gaucher disease and variant metachromatic leukodystrophy) (PSAP), mRNA	1
NM_001418	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2 (EIF4G2), mRNA	1
NM_001014795	Homo sapiens integrin-linked kinase (ILK), transcript variant 3, mRNA	1
NM_005780	Homo sapiens lipoma HMGIC fusion partner (LHFP), mRNA	1
NM_003825	Homo sapiens synaptosomal-associated protein, 23kDa (SNAP23), transcript variant 1, mRNA	1
NM_002211	Homo sapiens integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12) (ITGB1), transcript variant 1A, mRNA	1
NM_006435	Homo sapiens interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D) (IFITM2), mRNA	2
NM_003590	Homo sapiens cullin 3 (CUL3), mRNA	1

continua

continuação

NM_000884	Homo sapiens IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2 (IMPDH2), mRNA	1
NM_138793	Homo sapiens calcium activated nucleotidase 1 (CANT1), mRNA	1
XM_929760	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC646803 2 (LOC646803), mRNA	
NM_014719	Homo sapiens KIAA0738 gene product (KIAA0738), mRNA	1
NM_003295	Homo sapiens tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1), mRNA	17
NM_030789	Homo sapiens histocompatibility (minor) 13 (HM13), transcript variant 1, mRNA	2
NM_006196	Homo sapiens poly(rC) binding protein 1 (PCBP1), mRNA	1
NM_001878	Homo sapiens cellular retinoic acid binding protein 2 (CRABP2), mRNA	1
NM_001101	Homo sapiens actin, beta (ACTB), mRNA	6

continua

continuação

NM_001749	Homo sapiens calpain, small subunit 1 (CAPNS1), transcript variant 1, mRNA	7
NM_014320	Homo sapiens heme binding protein 2 (HEBP2), mRNA	2
NM_014799	Homo sapiens hephaestin (HEPH), transcript variant 2, mRNA	2
NM_021103	Homo sapiens thymosin, beta 10 (TMSB10), mRNA	4
NM_001540	Homo sapiens heat shock 27kDa protein 1 (HSPB1), mRNA	1
XM_498786	PREDICTED: Homo sapiens LOC440642 (LOC440642), mRNA	3
NM_018382	Homo sapiens hypothetical protein FLJ11292 (FLJ11292), mRNA	1
NM_181353	Homo sapiens inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein (ID1), transcript variant 2, mRNA	11
NM_021109	Homo sapiens thymosin, beta 4, X- linked (TMSB4X), mRNA	61
NM_000942	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B) (PPIB), mRNA	15

continua

continuação

NM_006769	Homo sapiens LIM domain only 4 (LMO4), mRNA	1
XM_943152	PREDICTED: Homo sapiens KIAA1245, transcript variant 12 (KIAA1245), mRNA	1
NM_203380	Homo sapiens acyl-CoA synthetase long-chain family member 5 (ACSL5), transcript variant 3, mRNA	1
XM_292160	PREDICTED: Homo sapiens similar to Serine/threonine-protein kinase Nek1 (NimA-related protein kinase 1) (MGC75495), mRNA	1
NM_198334	Homo sapiens glucosidase, alpha; neutral AB (GANAB), mRNA	1
NM_001280	Homo sapiens cold inducible RNA binding protein (CIRBP), mRNA	1
NM_018155	Homo sapiens hypothetical protein FLJ10618 (FLJ10618), mRNA	1
NM_001681	Homo sapiens ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2 (ATP2A2), transcript variant 2, mRNA	1
NM_003746	Homo sapiens dynein, cytoplasmic, light polypeptide 1 (DNCL1), mRNA	1

continuação

continua

NM_005347	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa) (HSPA5), mRNA	2
NM_002423	Homo sapiens matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine) (MMP7), mRNA	2
NM_000516	Homo sapiens GNAS complex locus (GNAS), transcript variant 1, mRNA	3
NM_147184	Homo sapiens tumor protein p53 inducible protein 3 (TP53I3), transcript variant 2, mRNA	1
NM_001256	Homo sapiens cell division cycle 27 (CDC27), mRNA	4
NM_002817	Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13 (PSMD13), transcript variant 1, mRNA	1
NM_012287	Homo sapiens centaurin, beta 2 (CENTB2), mRNA	1
NM_148923	Homo sapiens cytochrome b-5 (CYB5), transcript variant 1, mRNA	1
NM_175744	Homo sapiens ras homolog gene family, member C (RHOC), mRNA	3

continua

continuação

NM_138473	Homo sapiens Sp1 transcription factor (SP1), mRNA	2
NR_002836	Homo sapiens phosphoglucomutase 5 pseudogene 2 (PGM5P2) on 2 chromosome 9	
NM_022454	Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-box 17 (SOX17), mRNA	1
NM_001001937	Homo sapiens ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1, cardiac muscle (ATP5A1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA	2
NM_002970	Homo sapiens spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SAT), mRNA	7
NM_015937	Homo sapiens phosphatidylinositol glycan, class T (PIGT), mRNA	1
NM_005566	Homo sapiens lactate dehydrogenase A (LDHA), mRNA	2
NM_004425	Homo sapiens extracellular matrix protein 1 (ECM1), transcript variant 1, mRNA	2
NM_007273	Homo sapiens prohibitin 2 (PHB2), mRNA	1

continuação

continua

NM_005507	Homo sapiens cofilin 1 (non-muscle) (CFL1), mRNA	1
XM_928061	PREDICTED: Homo sapiens similar to Rho-associated protein kinase 1 (Rho-associated, coiled-coil containing 5 protein kinase 1) (p160 ROCK-1) (p160ROCK) (LOC653559), mRNA	
NM_021034	Homo sapiens interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U) (IFITM3), mRNA	3
NM_014402	Homo sapiens low molecular mass ubiquinone-binding protein (9.5kD) (QP-C), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA	1
NM_001743	Homo sapiens calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta) (CALM2), mRNA	1
NM_080594	Homo sapiens RNA binding protein S1, serine-rich domain (RNPS1), transcript variant 2, mRNA	1
NM_020378	Homo sapiens K562 cell-derived leucine-zipper-like protein 1 (KLP1), mRNA	1

continuação

continua

NM_153280	Homo sapiens ubiquitin-activating enzyme E1 (A1S9T and BN75 temperature sensitivity complementing) (UBE1), transcript variant 2, mRNA	1
NM_033161	Homo sapiens surfet 4 (SURF4), mRNA	1
NM_198335	Homo sapiens glucosidase, alpha; neutral AB (GANAB), mRNA	2
NM_006801	Homo sapiens KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 1 (KDEL1), mRNA	1
NM_001349	Homo sapiens aspartyl-tRNA synthetase (DARS), mRNA	1
NM_002567	Homo sapiens prostatic binding protein (PBP), mRNA	4
NM_004356	Homo sapiens CD81 antigen (target of antiproliferative antibody 1) (CD81), mRNA	2
NM_005576	Homo sapiens lysyl oxidase-like 1 (LOXL1), mRNA	1
NM_019111	Homo sapiens major histocompatibility complex, class II, DR alpha (HLA-DRA), mRNA	1

continua

continuação

NM_080546	Homo sapiens CDW92 antigen (CDW92), mRNA	1
NM_000733	Homo sapiens CD3E antigen, epsilon polypeptide (TiT3 complex) (CD3E), mRNA	1
XM_932180	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC644424 1 (LOC644424), mRNA	
NM_031157	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (HNRPA1), 1 transcript variant 2, mRNA	
XM_498569	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical gene supported by 1 AY338954 (LOC440155), mRNA	
NM_001009570	Homo sapiens chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta) (CCT7), transcript variant 2, mRNA	1
NM_001428	Homo sapiens enolase 1, (alpha) (ENO1), mRNA	1
NM_020320	Homo sapiens arginyl-tRNA synthetase-like (RARSL), mRNA	1
NM_001614	Homo sapiens actin, gamma 1 (ACTG1), mRNA	1

continuação

continua

NM_003164	Homo sapiens syntaxin 5A (STX5A), mRNA	1
XM_935538	PREDICTED: Homo sapiens similar to postmeiotic segregation increased 2-like 2 (LOC442573), mRNA	1
NM_013234	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 12 (EIF3S12), mRNA	1
NM_005762	Homo sapiens tripartite motif-containing 28 (TRIM28), mRNA	3
NM_014042	Homo sapiens DKFZP564M082 protein (DKFZP564M082), mRNA	1
XM_928302	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC643817 (LOC643817), mRNA	2
XM_496061	PREDICTED: Homo sapiens similar to FLJ44796 protein (LOC440264), mRNA	7 1
NM_004568	Homo sapiens serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6 (SERPINB6), mRNA	1

continua

continuação

NM_002166	Homo sapiens inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein (ID2), mRNA	2
NM_021129	Homo sapiens pyrophosphatase (inorganic) (PP), mRNA	1
NM_003064	Homo sapiens secretory leukocyte protease inhibitor (antileukoproteinase) (SLPI), mRNA	8
NM_021005	Homo sapiens nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2 (NR2F2), mRNA	2
NM_006585	Homo sapiens chaperonin containing TCP1, subunit 8 (theta) (CCT8), mRNA	1
Total de seqüências de referência		65 317
TOTAL DE COLÔNIAS ANALISADAS		524 537

Entre as seqüências RefSeq, referentes a genes bem caracterizados na literatura, obtivemos um total de 31 seqüências diferentes na biblioteca RHENDI e 135 na RHENDW. As classes levedura, bactéria e outros (vide ANEXO A) foram consideradas como contaminantes das reações. Já as classes mitocondrial, ribossômica, ESTs e Unigene não foram analisadas neste estudo (ANEXO B).

IV. 2. GENES SELECIONADOS

Os genes selecionados para validação dos dados de expressão gênica foram: *SPARC* (*secreted protein, acidic, cysteine-rich*); *SSAT* (*spermidine/spermine N1-acetyltransferase*); *HTRA1* [(*high temperature requirement factor A1*) *serine peptidase 1*] e *LOXL1* (*lysyl oxidase-like 1*).

IV. 3. RT-PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

As tabelas II, III, IV e V mostram os valores de RQ (*Relative Quantification*), referentes às expressões dos genes selecionados, em cada amostra, obtidos pela RT-PCR quantitativa em tempo real.

Tabela II: Valores de RQ, médias e desvios-padrão dos grupos de tecido normal e lesão endometriótica para o gene *SPARC*

<i>SPARC</i>	
ENDOMÉTRIO NORMAL	LESÃO ENDOMETRIÓTICA

AMOSTRA	RQ	AMOSTRA	RQ
11	0,63	O11	0,65
3.2	0,85	O3	0,98
6	0,88	P6	1,10
2	0,92	O10.2	1,32
5	1,24	O9	1,32
12	1,31	P10 ()	1,41
4	1,39	O6	1,83
9	1,97	P1	2,32
8	2,08	P3	3,02
1	2,25	P8	4,01
7	3,95	P7	6,21
Média	1,59	Média	2,20
Desvio padrão	0,95	Desvio padrão	1,66

Tabela III: Valores de RQ, médias e desvios-padrão dos grupos de tecido normal e lesão endometriótica para o gene *SSAT*

<i>SSAT</i>			
ENDOMÉTRIO NORMAL		LESÃO ENDOMETRIÓTICA	
AMOSTRA	RQ	AMOSTRA	RQ
4	0,44	O10.2	0,18
1	0,64	O3	0,30
2	0,65	O9	0,37
7	0,65	O11	0,56
3.2	0,96	O6	0,79
9	1,17	P6	0,99
5	1,44	P10()	1,12
12	2,38	P1	1,16
6	2,45	P3	1,38
8	4,50	P8	1,50
11	8,44	P7	2,11
Média	2,16	Média	0,95
Desvio padrão	2,40	Desvio padrão	0,59

Tabela IV: Valores de RQ, médias e desvios-padrão dos grupos de tecido normal e lesão endometriótica para o gene *HTRAI*

Gene <i>HTRAI</i>			
ENDOMÉTRIO NORMAL		LESÃO ENDOMETRIÓTICA	
AMOSTRA	RQ	AMOSTRA	RQ
11	0,55	O11	0,79
2	0,98	P6()	0,87
3.2	1,55	P10(2)	1,68
6	2,02	P3	4,77
5	2,33	P1	5,87
4	2,69	P8	6,09
9	3,06	P7	6,52
1	4,23	O3	10,96
7	4,42	O10.2	11,66
12	5,40	O9	12,59
8	5,50	O6	15,70
Média	2,97	Média	7,04
Desvio padrão	1,71	Desvio padrão	5,06

Tabela V: Valores de RQ, médias e desvios-padrão dos grupos de tecido normal e lesão endometriótica para o gene *LOXLI*

Gene <i>LOXLI</i>			
ENDOMÉTRIO NORMAL		LESÃO ENDOMETRIÓTICA	
AMOSTRA	RQ	AMOSTRA	RQ
1	1,12	O11	1,58
11	2,18	P1()	5,097
6	2,36	O3	5,62
4	2,59	P6()	6,87
2	2,62	P3	7,47
5	2,63	P10()	9,05
3.2	3,11	P7()	9,35
9	3,38	O10.2	10,96
12	3,93	O9	11,03
8	4,98	O6	12,84
7	11,51	P8()	36,76
Média	3,67	Média	10,60
Desvio padrão	2,78	Desvio padrão	9,24

IV. 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste da soma de postos de Wilcoxon mostrou que os genes *SSAT* e *SPARC* não apresentaram diferença significativa de expressão entre os grupos de mulheres com e sem endometriose, enquanto que os genes *HTRA1* e *LOXL1* apresentaram diferença quanto a sua expressão nos dois grupos.

Para o gene *HTRA1*, foi obtida área abaixo da curva ROC de 0,75, mostrando sensibilidade de 63,6% e especificidade de 100% para separação entre os grupos de mulheres com e sem endometriose. Para o gene *LOXL1*, a área abaixo da curva ROC foi de 0,85, determinando sensibilidade e especificidade de 90,9% para distinção entre os grupos. O diagrama de pontos interativos mostra valor de corte de RQ do gene *HTRA1* de 5,5 e de 5,0 para o gene *LOXL1*. As figuras 4 e 5 representam o diagrama de pontos interativos para os genes *HTRA1* e *LOXL1*, respectivamente.

Figura 4: Diagrama de pontos interativos (*interactive dot*) para o gene *HTRA1* obtido a partir do *software* MedCalc (<http://www.medcalc.be>). O eixo vertical representa valores de RQ. Os pontos do gráfico mostram a distribuição dos valores das RQs obtidas nos grupos de mulheres sem endometriose (representados no eixo horizontal como “Normal=0”) e nas amostras do

grupo de mulheres com a doença (representados no eixo horizontal como “Endometriose=1”).
A barra horizontal mostra o melhor ponto de corte para separação dos grupos.

Figura 5: Diagrama de pontos interativos (*interactive dot*) para o gene *LOXL1* obtido a partir do *software* MedCalc (<http://www.medcalc.be>). O eixo vertical representa valores de RQ. Os pontos do gráfico mostram a distribuição dos valores das RQs obtidas nos grupos de mulheres sem endometriose (representados no eixo horizontal como “Normal=0”) e nas amostras do grupo de mulheres com a doença (representados no eixo horizontal como “Endometriose=1”). A barra horizontal mostra o melhor ponto de corte para separação dos dois grupos.

V. DISCUSSÃO

A confecção de biblioteca subtrativa é aplicada com sucesso para clonar seqüências de RNA mensageiro mais abundantes em uma determinada amostra, quando comparada à outra (Cho & Park, 1998). A técnica de hibridação subtrativa rápida (*RaSH*) identifica genes diferencialmente expressos, incluindo seqüências descritas e não descritas nos bancos de dados disponíveis (Jiang *et al.*, 2000). Uma das vantagens da *RaSH* sobre as demais técnicas é que ela elimina vários passos de subtração e amplificação, fazendo com que a metodologia tenha menor complexidade e seja mais rápida e econômica. Além disso, é efetiva para obtenção da fração *tester-tester* da reação e para reduzir os *backgrounds*, gerando resultados confiáveis (Jiang *et al.*, 2000; Boukerche *et al.*, 2004).

No entanto, os métodos baseados em hibridação subtrativa possuem certas limitações, pois nem sempre todas as seqüências de cDNA comuns entre os grupos são completamente removidas, levando a alguns resultados falso-positivos (Hu *et al.*, 2006). O sucesso da técnica requer remoção efetiva dos híbridos *tester-driver* para assegurar boa eficiência da reação, a qual pode ser influenciada por vários fatores, como concentrações de DNA e sal, além da quantidade de *tester-driver* gerada (Cho & Park, 1998). Dessa maneira, deve-se estabelecer uma boa metodologia para validação dos resultados. A RT-PCR quantitativa em tempo real é considerada a metodologia padrão para quantificação da expressão gênica, pois consegue medir desde grandes até quantidades muito pequenas de transcritos, mostrando alta sensibilidade além de alta especificidade quando comparadas a outras técnicas, como, por exemplo, *Northern blot* (Goodsaid *et al.*, 2003).

Em nosso trabalho, as bibliotecas RHENDI e RHENDW foram geradas a partir da subtração de moléculas de cDNA entre os grupos de mulheres com e sem endometriose. Consideramos que o conjunto de cDNAs presentes em uma biblioteca são referentes a genes

superexpressos no grupo *tester* em relação ao grupo *driver*, onde esses genes foram menos expressos.

As seqüências selecionadas como candidatas para validação por RT-PCR quantitativa em tempo real foram referentes aos genes *HTRA1*, *LOXL1*, *SPARC* e *SSAT*, os quais apresentaram baixa expressão no grupo de mulheres com endometriose.

V. 1. *HTRA1* - HtrA (*high temperature requirement factor A1*) serine peptidase 1

O gene *HTRA1*, conhecido também como *L56*, *HtrA*, *ORF480* e *PRSS11*, codifica uma enzima secretada pertencente à família das serino-proteases, altamente conservada em várias espécies (GeneID 5654; OMIM [602194](#)). A alta expressão desta proteína inibe a proliferação celular *in vivo* e *in vitro*. Além disso, o locus 10q26, onde se encontra o gene, está sujeito à perda de heterozigosidade e inativação epigenética, sugerindo assim função de supressor tumoral para o mesmo (Baldi *et al.*, 2002; Chien *et al.*, 2004). Alguns trabalhos confirmaram essa hipótese, mostrando que sua baixa expressão está relacionada a certos tipos de câncer, como o endometrial, além de estar fortemente associado à transformação maligna e metástase de câncer ovariano e melanoma maligno (Bowden *et al.*, 2006; Tsuchiya *et al.*, 2005). A observação de que ocorre regulação hepática da transcrição de *HTRA1* entre a fase fetal e pós-natal propõe que o gene participa do controle do crescimento celular não apenas em neoplasias, como também de processos fisiológicos normais (Nagata *et al.*, 2003). Outro fato importante é que a proteína HTRA1 é produzida em quantidade proeminente pelo endométrio na fase proliferativa do ciclo menstrual e, por isso, sugere-se que sua expressão possa ser importante na preparação endometrial para a implantação embrionária (Bowden *et al.*, 2006; De Luca *et al.*, 2003).

Selecionamos este gene para validação considerando que estava menos expresso no grupo de mulheres com endometriose, segundo dados obtidos pela *RaSH*, sendo que sua baixa expressão tem sido relacionada a neoplasias comumente associadas à doença, como câncer ovariano e endometrial. Adicionalmente, a proteína codificada por ele, quando altamente expressa, provoca inibição do crescimento celular e, dessa forma, a baixa expressão geraria ambiente propício para que as células endometriais se proliferassem, produzindo lesões. Ponderamos também o fato de que a baixa expressão desse gene na fase proliferativa do ciclo menstrual poderia causar alteração da receptividade endometrial durante a fase de implantação do embrião, prejudicando, assim, a função reprodutiva de pacientes com endometriose.

Todavia, quando executamos a RT-PCR quantitativa em tempo real, a média de RQ deste gene para mulheres com endometriose foi de 7,04, enquanto que para as mulheres sem endometriose foi de 2,97, contrariando os dados obtidos pela *RaSH*. Tendo em vista que a RT-PCR quantitativa em tempo real é a técnica padrão para determinação dos níveis de expressão gênica, consideramos esse resultado como verdadeiro.

A proteína HTRA1 também interage com alguns fatores reguladores da proliferação celular, como IGFs e TGF- β 1 (Zumbrunn & Trueb, 1996; Tocharus *et al.*, 2004). As IGFs (*Insuline Growth Factors*) atuam em diversos tecidos, estimulando divisão e diferenciação celulares. Sua atividade é modulada por moléculas inibidoras, as IGFBPs, que se ligam às IGFs e controlam a disponibilidade desses fatores de crescimento (Clemmons, 1998). No entanto, existem enzimas, como HTRA1, que podem clivar essas IGFBPs e dessa maneira aumentar os níveis de IGFs bioativas (Zumbrunn & Trueb, 1996; Ferry *et al.*, 1999; Hou *et al.*, 2005). Uma vez livres para agirem, as IGFs promoveriam crescimento celular, efeito compatível com os achados científicos em lesões endometrióticas.

Já TGF- β 1 é um regulador negativo da proliferação celular, cuja expressão está reduzida em células de endométrio típico de pacientes com endometriose, sugerindo que a diminuição desse fator possa favorecer a proliferação dessas células (Johnson *et al.* 2005). Foi proposto que HTRA1 se liga a TGF- β 1, inibindo as vias de sinalização dessa molécula (Kresse & Schönherr, 2001; Oka *et al.*, 2004). Desse modo a maior expressão de HTRA1 neutralizaria a ação de maior quantidade de moléculas TGF- β 1, propiciando maior multiplicação de células endometriais ectópicas.

Além disso, as mulheres apresentam normalmente alta expressão de HTRA1 na fase proliferativa do ciclo reprodutivo (De Luca *et al.*, 2003). Visto que estudamos mulheres com e sem endometriose na mesma fase do ciclo, podemos sugerir que o aumento ainda maior da expressão do gene *HTRA1* em mulheres com a enfermidade causaria consequências reprodutivas graves para elas, como falhas de implantação.

Quanto à análise da curva ROC, *HTRA1* mostrou especificidade alta, porém sua sensibilidade, de 63,6%, foi baixa para discriminar mulheres com daquelas sem a doença. Provavelmente os níveis de expressão de *HTRA1*, muito discrepantes entre as pacientes, provocou grande aumento do desvio-padrão, contribuindo para esse resultado.

Analisando o gráfico de pontos interativos, podemos observar que para valores de RQ abaixo de 5,5, foi possível separar mulheres sem endometriose daquelas com endometriose, apesar de duas amostras do grupo de mulheres não afetadas pela doença apresentarem RQs muito próximas a esse ponto de corte. Já no grupo de mulheres afetadas, existe uma diferença muito variável entre RQs. Quatro pacientes desse grupo possuem RQs abaixo de 5,5, apresentando, portanto, expressão do gene *HTRA1* igual à das mulheres não afetadas pela endometriose. Dessa forma, podemos afirmar que no grupo amostral estudado, pela análise da expressão de *HTRA1*, não foi possível diferenciar todas as pacientes com endometriose. Como a proteína HTRA1 interage com moléculas reguladoras do crescimento celular, estimulando-

o, podemos supor que, nessas quatro pacientes, a baixa expressão do gene que a codifica tenha conferido um potencial de crescimento menor que o das demais pacientes. Podemos presumir também que as 2 mulheres não afetadas pela endometriose com RQs de 5,40 e 5,50, por apresentarem expressão gênica de *HTRAI* muito próximas ao padrão de expressão das afetadas, apresentavam células endometriais com atividade proliferativa maior que as outras mulheres do seu grupo. Provavelmente isso acarretaria predisposição dessas células em crescer em locais ectópicos, como ovário e/ou peritônio e, assim, desenvolverem endometriose. Porém, somente o acompanhamento clínico a longo prazo dessas mulheres com concomitante quantificação da expressão de *HTRAI* poderia corroborar para a hipótese.

V. 2. *LOXLI* - lysyl oxidase-like 1

O gene *LOXLI*, também denominado *LOL* e *LOXL*, codifica uma amino oxidase essencial na biogênese de tecido conjuntivo por catalisar, na matriz extracelular, o primeiro passo para formação de ligações covalentes cruzadas de fibras de colágeno e de elastina, necessárias para homeostase de diversos tecidos, incluindo órgãos pélvicos femininos, principalmente durante a gestação e parto (GeneID 4016; OMIM [153456](#); Kagan & Li, 2003; Liu *et al.*, 2004). Wu *et al.*, em 2007, descreveram genes hipermetilados, isto é, silenciados, em células cancerosas de bexiga humana, dentre os quais *LOXLI* estava presente. Além disso, foi encontrada baixa expressão do gene em câncer de próstata e carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, sugerindo ação supressora tumoral para ele (Ren *et al.*, 1998; Rost *et al.*, 2003). Em 2006, Flores e colaboradores, usaram *microarrays*, identificando baixa quantidade de transcritos de *LOXLI* a partir de RNAs mensageiros isolados de linfócitos de sangue periférico de pacientes com endometriose quando comparadas a pacientes sem a doença, sugerindo ser esse gene candidato a marcador sanguíneo para a doença.

O gene *LOXLI* foi selecionado para validação uma vez que foi menos expresso no grupo de mulheres com endometriose, segundo dados obtidos pela *RaSH*, o que é coerente com o resultado do trabalho que analisou linfócitos de sangue periférico de mulheres afetadas pela doença. Também consideramos o fato de que se trata de um gene candidato a supressor tumoral e, assim, sua baixa expressão poderia aumentar a taxa de multiplicação celular, permitindo estabelecimento da doença. Entretanto, analisando os resultados de expressão obtidos pela RT-PCR quantitativa em tempo real, observamos maior média dos níveis de expressão de *LOXLI* em mulheres com a doença (10,60) em comparação com mulheres não afetadas (3,67), contrapondo o dado obtido pela *RaSH*.

Quanto à função do gene, sugerimos que um aumento da expressão poderia aumentar a biogênese de tecido conjuntivo, levando ao aparecimento de lesões endometrióticas. Assim, a alta expressão de *LOXLI* poderia contribuir para o estabelecimento das células endometriais fora da cavidade uterina por permitir que elas mantenham-se ligadas, em contato, com outros tecidos.

Em relação ao valor diagnóstico, consideramos que os dados obtidos em nosso trabalho foram mais fidedignos que os descritos por Flores e colaboradores (2006), que pesquisaram alterações de expressão gênica no sangue periférico de pacientes com e sem endometriose. Apesar de se tratar de uma doença de caráter inflamatório e as células decorrentes desse processo poderem circular no sangue, a metodologia executada envolveu pesquisa de genes não específicos do tecido endometriótico. Logo, a investigação da expressão de genes sem uma pesquisa prévia referente ao local da lesão não permite a obtenção de dados consistentes para afirmar que *LOXLI* tem baixa expressão em portadoras da doença.

Levando em conta que a endometriose possui características similares a processos neoplásicos, outro fato interessante é que no câncer de mama metastático, *LOXLI* encontra-se

altamente expresso, o que está de acordo com nossos resultados obtidos pela RT-PCR quantitativa em tempo real para as mulheres com endometriose (Wu *et al.*, 2007).

Em relação à análise da curva ROC, *LOXLI* apresentou especificidade e sensibilidade altas (90,9%), o que pode ser considerado bom parâmetro para distinção entre mulheres afetadas e não afetadas pela endometriose, permitindo-nos sugerir que o gene pode ser candidato a marcador da doença.

Examinando o gráfico de pontos interativos, observamos que o valor de corte de RQ de 5,0 pode ser considerado eficiente para separação entre as mulheres com e sem endometriose. No entanto, no grupo afetado, uma paciente mostrou RQ abaixo de 5,0, em conformidade com as RQs da maioria das mulheres sem a doença, e no grupo não afetado, uma mulher teve valor de RQ acima do ponto de corte, considerado como pertencente à maioria do grupo das mulheres com endometriose analisadas neste estudo. Além disso, no grupo I, uma paciente apresentou valor de 5,09 e no grupo II, uma mulher apresentou valor de 4,98, valores muito próximos ao de corte. Esses dados demonstraram que 9,09% das mulheres (2 em 22) não foram discriminadas com sucesso entre os dois grupos e a mesma porcentagem incluiu mulheres com RQs próximas ao limite de separação entre os dois grupos.

Paralelamente, houve maior dispersão de RQ no grupo de mulheres com endometriose em relação aos valores das RQs de mulheres sem a doença, sendo que um dos dados obtidos foi muito alto em relação à média (RQ = 36,76). A alta expressão de *LOXLI* pode significar que essa paciente possa ser mais resistente ao desenvolvimento da doença em relação às outras pacientes estudadas, uma vez que nela seria necessária expressão muito alta do gene para que as lesões se estabelecessem.

Torna-se necessário aumentar o número de mulheres em estudos posteriores, visando avaliar se os níveis de expressão de *LOXLI* podem ser eficazes para a separação de mulheres afetadas das não afetadas pela doença.

Se os resultados de nosso estudo estiverem em concordância com a distribuição real das RQs de *LOXLI* da população de mulheres com e sem endometriose, para a amostra 7 do grupo não afetado (RQ = 11,50) em que o gene *LOXLI* está se expressando igual ao grupo de mulheres afetadas pela endometriose, podemos especular que essa mulher pode não ter focos endometrióticos visíveis, mas é portadora da doença. Também podemos hipotetizar que a paciente com expressão de *LOXLI* igual à média das mulheres sem endometriose, apesar de ser afetada, possui células endometriais cujo estabelecimento em locais ectópicos seja mais fácil de ocorrer, já que nesta bastaria baixa expressão do gene em questão para desenvolvimento da doença.

V. 3. *SPARC* - secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)

O gene *SPARC*, ou *ON*, codifica uma glicoproteína secretada multifuncional que está associada à matriz extracelular (MEC) onde se liga a um grande número de moléculas e exerce ação antiadesiva, o que inclui habilidade em desfazer adesões locais (Hudson *et al.*, 2005). Além disso, *SPARC* atua estimulando alterações no formato celular, inibindo a progressão do ciclo celular, influenciando a síntese de elementos da MEC e modulando interações célula-matriz (GeneID 6678; OMIM [182120](#)). Também foi demonstrado que *SPARC* reforça o sistema de sinalização de TGF- β , citocina responsável, dentre outras funções, pela ativação da síntese de componentes da MEC, como colágeno, pela supressão da expressão de metaloproteinases de matriz e indução de expressão de inibidores teciduais dessas enzimas (Schiemann *et al.*, 2003; Poncelet *et al.*, 1998).

Em relação ao câncer, em células de carcinoma ovariano humano foi encontrada baixa expressão de *SPARC* e nessas células a expressão dessa molécula induz apoptose (Mok *et al.*, 1996; Yiu *et al.*, 2001). Esses resultados foram corroborados pelo fato de que, em ratos, na

ausência da expressão desse gene ocorria a formação de ambiente permissivo para o crescimento e invasão tumorais de células ovarianas (Said & Motamed, 2005). Além do mais, em ratos com mutação nula para *SPARC* e inoculados com células de câncer pancreático ou pulmonar, foram encontradas alterações na produção e organização de componentes da MEC no interior e na cápsula dos implantes tumorais, gerando menor restrição para a progressão tumoral e metástase (Brekken *et al.*, 2003).

Outra informação interessante é o fato de que *SPARC* possui ação antiangiogênica por se ligar diretamente a VEGF, inibindo a proliferação celular endotelial e por bloquear o efeito mitogênico de bFGF, um potente estimulador da angiogênese (Chlenski *et al.*, 2006).

Devido ao fato de *SPARC* ter sido menos expresso no grupo das pacientes com endometriose, a partir dos dados obtidos pela *RaSH*, selecionamos esse gene para validação, uma vez que a redução de sua expressão pode gerar proliferação celular, angiogênese e redução de apoptose, processos importantes para estabelecimento de lesões endometrióticas. Outrossim, colabora para o desenvolvimento da doença, processos semelhantes aos que ocorrem durante o aparecimento e desenvolvimento de tumores, tais como adesão, crescimento e invasão. Além disso, quanto menor a expressão de *SPARC*, menor interação com TGF- β , regulador negativo da proliferação celular, o que favorece a formação de lesões. Outra consequência dessa baixa interação é o aumento da produção de enzimas proteolíticas da MEC, o que facilita a invasão tecidual e, conseqüentemente permite estabelecimento das células endometriais em local ectópico. Em nossa amostra, não detectamos diferença significativa nos níveis de expressão de *SPARC* entre os grupos de mulheres com e sem endometriose, por meio da RT-PCR quantitativa em tempo real. Esse resultado sugere que provavelmente esse gene não represente a classe de moléculas com expressão alterada que atuam no desenvolvimento da endometriose. Assim, acreditamos que devam existir outros elementos que desempenhem funções semelhantes a *SPARC* nos processos dos quais essa

molécula participa, tais como adesão, invasão, angiogênese e resistência à apoptose, e que possivelmente estejam relacionados ao estabelecimento da doença.

V. 4. *SSAT* - spermidine/spermine N1-acetyltransferase

O gene *SSAT*, cujas aliases são *SAT*, *DC21* e *KFSD*, codifica a enzima spermidina/spermina N1-acetiltransferase, que promove N(1)-acetilação de spermidina e spermina na via catabólica de poliaminas, que são moléculas requeridas para o crescimento e diferenciação normais da célula (GeneID 6303; OMIM [313020](#); Huang *et al.*, 2005). Em *Escherichia coli*, a indução de *SSAT* converte rapidamente espermidina em N1-acetilespermidina, resultando em redução da taxa de crescimento celular (Parry *et al.*, 1995). Em 2005, Pledgie e colaboradores observaram efeito antiproliferativo de células de câncer de mama quando a expressão de *SSAT* foi induzida. Além disso, nesse mesmo trabalho foi elaborada a hipótese de que outro produto decorrente da catálise de poliaminas, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espécie reativa conhecida por provocar danos no DNA, teria efeito inibitório no crescimento celular. Dessa maneira, pode-se concluir que a baixa expressão de *SSAT* promoveria redução da catálise de poliaminas, e conseqüente diminuição da produção de peróxido de hidrogênio, aumentando, assim, a taxa de proliferação celular.

Os dados acima concordam com os obtidos em nosso trabalho por meio da *RaSH*, já que a baixa expressão de *SSAT* em mulheres com endometriose poderia aumentar a quantidade de poliaminas ativas no interior de células endometrióticas, levando-as a uma maior proliferação. Adicionalmente, nesse caso, a quantidade de H_2O_2 estaria reduzida, o que impediria que a multiplicação dessas células fosse prejudicada. Por esses motivos selecionamos também *SSAT* para validação.

Não foi observada, por RT-PCR quantitativa em tempo real, diferença significativa na expressão de *SSAT* entre os grupos de afetadas e não afetadas pela endometriose, sugerindo que essa molécula não participe do processo responsável pelo início e manutenção da doença. Assim, acreditamos que outras moléculas participam de vias relacionadas à proliferação celular nos mecanismos que levam ao desencadeamento da endometriose.

A partir da análise das seqüências diferencialmente expressas entre as mulheres com e sem endometriose, podemos dizer que a grande maioria das seqüências de referência obtidas foi identificada neste estudo pela primeira vez e que nossos resultados não confirmaram alguns dados publicados anteriormente sobre a expressão de genes específicos na doença.

A biblioteca RHENDW identificou seqüências referentes aos genes das metaloproteinases MMP2 e MMP7, ambos descritos em publicações anteriores. As metaloproteinases são enzimas proteolíticas que atuam em conjunto com seus inibidores, denominados TIMPs, para remodelamento e renovação da matriz extracelular (Yang *et al.*, 2004). A expressão desregulada de qualquer uma dessas moléculas tem sido associada a doenças que envolvem fenômenos invasivos, como processos tumorais e endometriose (Roughley & Lee, 1994; Sillem *et al.*, 1998).

Em discordância com nossos dados, alguns trabalhos evidenciaram aumento de expressão de MMP2 tanto em tecido ectópico quanto tópico de mulheres com diagnóstico de endometriose, quando comparada a mulheres não afetadas (Wenzl & Heinzl, 1998; Chung *et al.*, 2002). Entretanto, Sharpe-Timms (1997) descreveram altos níveis de expressão de MMP7 no endométrio tópico, mas expressão constitutiva desta metaloproteinase em lesões endometrióticas, durante o ciclo menstrual.

Desta maneira, apesar de termos obtido resultados discordantes da literatura, acreditamos que a *RaSH* foi eficiente na identificação de transcritos diferencialmente expressos entre as amostras analisadas.

Prova disso é a observação de que entre os dois grupos estudados, houve diferença significativa na expressão dos genes *HTRA1* e *LOXLI*, após validação por RT-PCR quantitativa em tempo real. Investigações futuras envolvendo maior número de amostras podem confirmar nossos resultados em relação ao aumento de expressão de *HTRA1* e *LOXLI* em pacientes com endometriose, quando comparadas a mulheres sem a doença, estabelecendo valores de corte mais confiáveis para separação desses dois grupos. Sugerimos que esses dois genes possam estar envolvidos nos processos biológicos de desenvolvimento da doença, podendo ser selecionados como marcadores moleculares para diagnóstico de endometriose.

VI. CONCLUSÕES

1) A técnica de *RaSH* foi eficaz na identificação de genes diferencialmente expressos no tecido endometrial de mulheres sem endometriose, em comparação a genes expressos em lesões endometrióticas de pacientes analisadas neste trabalho;

2) Os genes *HTRA1* e *LOXLI* mostraram diferença significativa entre o tecido endometrial tópico e ectópico, sugerindo possível envolvimento entre expressão aumentada desses genes e desenvolvimento da endometriose;

3) Os genes *HTRA1* e *LOXLI* podem ser considerados candidatos a marcadores moleculares para o diagnóstico não invasivo de endometriose.

4) Apesar de ter sido possível a identificação dos genes *SSAT* e *SPARC*, diferencialmente expressos pela técnica de *RaSH*, os resultados obtidos pela técnica de PCR em tempo real não confirmaram diferença de expressão desses genes nos dois grupos analisados;

VII. REFERÊNCIAS

Arya, P & Shaw, R. Endometriosis: Current thinking. **Current Obstetrics & Gynaecology**, v. 15, p. 191–8, 2005.

ASRM Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. **Fertility and Sterility**, v. 67, p. 817-21, 1997.

Baldi, A; De Luca, A; Morini, M; Battista, T; Felsani, A; Baldi, F *et al.* The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. **Oncogene**, v. 21(43), p. 6684-8, 2002.

Barlow, DH & Kennedy, S. Endometriosis: new genetic approaches and therapy. **Annual Review of Medicine**, v. 56, p. 345-56, 2005.

[Béliard, A](#); [Donnez, J](#); [Nisolle, M](#) and [Foidart, JM](#). Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 67(2), p. 266-72, 1997.

Bergqvist, A; Melin, A; Sparén, A. Endometriosis and the risk of malignancy, especially ovarian cancer. **International Congress Series**, v. 1271, p. 232– 5, 2004.

Bernabeu, R; Roca, M; Torres, A and Ten, J. Indomethacin effect on implantation rates in oocyte recipients. **Human Reproduction**, v. 21(2), p. 364-92, 2005.

Bischoff, F & Simpson, JL. Genetics of endometriosis: heritability and candidate genes. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 18(2), p. 219-32, 2004.

Boukerche, H; Su, Z-Z; Kang, D-C and Fisher, PB. Identification and cloning of genes displaying elevated expression as a consequence of metastatic progression in human melanoma cells by rapid subtraction hybridization. **Gene**, v. 343, p. 191–201, 2004.

Bowden, MA; Di Nezza-Cossens, LA; Jobling, T; Salamonsen, LA and Nie, G. Serine proteases HTRA1 and HTRA3 are down-regulated with increasing grades of human endometrial cancer. **Gynecologic oncology**, v. 103(1), p. 253-60, 2006.

Braun, DP & Dmowski, WP. Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 10, p. 365-69, 1998.

Braun, DP; Ding, J; Shen, J; Rana, N; Fernandez, BB, and Dmowski, WP. Relationship between apoptosis and the number of macrophages in eutopic endometrium from women with and without endometriosis, **Fertility and Sterility**, v. 78(4), p. 830-5, 2002.

Braun, DP; Ding, J; Shaheen, F; Willey, JC; Rana, N and Dmowski, WP. Quantitative expression of apoptosis-regulating genes in endometrium from women with and without endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 87(2), p. 263-8, 2007.

Brekken, RA; Puolakkainen, P; Graves, DC; Workman, G; Lubkin, SR and Sage, EH. Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p. 487–95, 2003.

Brosens, J; Timmerman, D; Starzinski-Powitz, A and Brosens, I. Noninvasive diagnosis of endometriosis: the role of imaging and markers. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 30, p. 95–114, 2003.

Brosens, I; Puttemans, P; Campo, R; Gordts, S and Kinkel, K. Diagnosis of endometriosis: pelvic endoscopy and imaging techniques. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 18(2), p 285-303, 2004.

Bulletti, C; Flamigni, C & Giacomucci, E. Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. **Human Reproduction Update**, v. 2(2), p. 118-36, 1996.

Chien, J; Staub, J; Hu, SI; Erickson-Johnson, MR; Couch, FJ, Smith, DI, *et al.* A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer. **Oncogene**, v. 23(8), p. 1636-44, 2004.

Chlenski, A; Liu, S; Guerrero, LJ; Yang, Q; Tian, Y; Salwen, HR *et al.* SPARC expression is associated with impaired tumor growth, inhibited angiogenesis and changes in the extracellular matrix. **International Journal of Cancer**, v. 118(2), p. 310-6, 2006.

Cho, TJ & Park, SS. A simulation of subtractive hybridization. **Nucleic Acids Research**, v. 26(6), p. 1440-8, 1998.

Chung, HW; Lee, JY; Moon, HS; Hur, SE; Park, MH; Wen, Y *et al.* Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium. **Fertility and Sterility**, v. 78(4), p. 787-95, 2002.

Clemmons, DR. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 140, p. 19-24, 1998.

Cox, KE; Piva, M, and Sharpe-Timms, KL. Differential regulation of matrix metalloproteinase-3 gene expression in endometriotic lesions compared with endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 65(4), p. 1297-303, 2001.

De Luca, A; De Falco, M; Severino, A; Campioni, M; Santini, D; Baldi, F, *et al.* Distribution of the serine protease HtrA1 in normal human tissues. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 51(10), p. 1279-84, 2003.

de Sá Rosa e Silva, AC; Rosa e Silva, JC; Nogueira, AA; Petta, CA; Abrao, MS and Ferriani RA. The levonorgestrel-releasing intrauterine device reduces CA-125 serum levels in patients with endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 86(3), p. 742-4, 2006.

Dmowski, WP & Braun, DP. Immunology of endometriosis. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 18, p. 245–63, 2004.

Dmowski, WP; Pry, M; Ding J and Rana N. Cycle-specific and cumulative fecundity in patients with endometriosis who are undergoing controlled ovarian hyperstimulation-intrauterine insemination or in vitro fertilization-embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v. 78(4), p. 750-6, 2002.

Donnez, J; Smoes, P; Gillerot, S; Casanas-Roux, F and Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. **Human Reproduction**, v. 13(6), p. 1686-90, 1998.

Esfandiari, N; Khazaei, M; Ai, J; Bielecki, R; Gotlieb, L; Ryan, E *et al.* Effect of a statin on an in vitro model of endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 87(2), p. 257-62, 2007.

Eyster, KM; Boles, AL; Brannian, JD and Hansen, KA. DNA microarray analysis of gene expression markers of endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 77(1), p. 38-42, 2002.

Ferry, RJ; Katz, LE; Grimberg, A; Cohen, P and Weinzimer, SA. Cellular actions of insulin-like growth factor binding proteins. **Hormone and metabolic research. Supplement series**, v. 31(2-3), p. 192-202, 1999.

Flores, I; Rivera, E; Mousses, S; Chen, Y and Rozenblum, E. Identification of molecular markers for endometriosis in blood lymphocytes by using deoxyribonucleic acid microarrays. **Fertility and Sterility**, v. 85(6), p. 1676-83, 2006.

Gaetje, R; Kotzian, S; Hermann, G; Baumann, R and Starzinski-Powitz, A. Invasiveness of endometriotic cells in vitro. **Lancet**, v. 346, p. 1463-64, 1995.

Gagné, D; Pagé, M; Robitaille, G; Hugo, P and Gosselin, D. Levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum of patients with endometriosis. **Human Reproduction**, v. 18(8), p. 1674-80, 2003.

Giudice, LC; Telles, TL; Lobo, S and Kao, L. The Molecular Basis for Implantation Failure in Endometriosis. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 955, p. 252-64, 2002.

Giudice, LC & Kao, LC. Endometriosis. **Lancet**, v. 364, p 1789–99, 2004.

Gnoth, C; Godehardt, E; Frank-Herrmann, P; Friol, K; Tigges, J and Freundl, G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. **Human Reproduction**, v. 20(5), p. 1144-7, 2005.

Gogusev, J; Bouquet de Joliniere, J; Telvi, L; Doussau, M; du Manoir, S; Stojkoski, A *et al.* Detection of DNA copy number changes in human endometriosis by comparative genomic hybridization **Human Genetics**, v. 105, p. 444–451, 1999.

Gogusev, J; Bouquet de Joliniere, J; Telvi, L; Doussau, M; du Manoir, S; Stojkoski, A *et al.* Genetic abnormalities detected by comparative genomic hybridization in a human endometriosis-derived cell line. **Molecular Human Reproduction**, v. 6(9), p. 821-7, 2000.

Goodsaid, FM; Palamanda, JR; Montgomery, D; Mandakas, G; Gu, C, Li, Z, *et al.* Assessment of temporal biochemical and gene transcription changes in rat liver cytochrome

P450: utility of real-time quantitative RT-PCR. **Pharmaceutical Research**, v. 20(9), p. 1373-80, 2003.

Guo, S-W; Wu, Y; Strawnb, E; Basirc, Z ; Wangd, Y ; Halversonb, G *et al.* Genomic alterations in the endometrium may be a proximate cause for endometriosis. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 116(1), p. 89-9, 2004.

Gustofson, RL; Kim, N; Liu, S and Stratton, P. Endometriosis and the appendix: a case series and comprehensive review of the literature. **Fertility and Sterility**, v. 86(2), p. 298-303, 2006.

Hammond, MG; Oh, ST; Anners, J; Surrey ES and Halme J. The effect of growth factors on the proliferation of human endometrial stromal cells in culture. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 168(4), p. 1131-6, 1993.

Harada, T; Kubota, T & Aso, T. Usefulness of CA19-9 versus CA125 for the diagnosis of endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 78(4), p. 733-9, 2002.

Hassa, H; Tanir, HM & Uray, M. Symptom distribution among infertile and fertile endometriosis cases with different stages and localizations. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, v. 119(1), p. 82-6, 2005.

Healy, DL; Trouson, AO & Andersen, NA. Female infertility: causes and treatment. **Lancet**, v. 343, p. 373-82, 1994.

Healy, DL; [Rogers, PA](#); [Hii, L](#) and [Wingfield, M](#). Angiogenesis: a new theory for endometriosis. **Human Reproduction Update**, v. 4(5), p. 736-40, 1998.

Horcajadas, JA; Riesewijk, A; Martin, J; Cervero, A; Mosselman, S; Pellicer, A *et al*. Global gene expression profiling of human endometrial receptivity. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 63(1), p. 41-9, 2004.

Horcajadas, JA; Pellicer, A & Simon, C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. **Human Reproduction Update**, v. 13(1), p. 77-86, 2007.

Hou, J; Clemmons, DR and Smeekens, S. Expression and characterization of a serine protease that preferentially cleaves insulin-like growth factor binding protein-5. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 94, p. 470–84, 2005.

Hu, W; Tay, SK and Zhao, Y. Endometriosis-specific genes identified by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction expression profiling of endometriosis *versus* autologous uterine endometrium. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, p. 228–38, 2005.

Huang, B; Vetting, MW and Roderick, SL. The active site of O-acetylserine sulphydrylase is the anchor point for bienzyme complex formation with serine acetyltransferase. **Journal of Bacteriology**, v. 187(9), p.3201-5, 2005.

Hudson, AE; Feng, WC; Delostrinos, CF; Carmean, N and Bassuk, JA. Spreading of embryologically distinct urothelial cells is inhibited by SPARC. **Journal of Cellular Physiology**, v. 202(2), p. 453-63, 2005.

Jiang, H; Kang, DC; Alexandre, D and Fisher, PB. RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97(23), p. 12684-9, 2000.

Jones, RK; Searle, RF & Bulmer, JN. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. **Human Reproduction**, v. 13(12), p.3496-502, 1998.

[Johnson, MC](#); [Torres, M](#); [Alves, A](#); [Bacallao, K](#); [Fuentes, A](#); [Vega, M](#) *et al.* Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 3:45, 2005 (doi:10.1186/1477-7827-3-45).

Jose-Miller, AB; Boyden, JW & Frey, KA. Infertility. **American Family Physician**, v. 75(6), p. 849-56, 2007.

Judson, PL; Temple, AM; Fowler, WCJr; Novotny, DB and Funkhouser, WKJr. Vaginal adenosarcoma arising from endometriosis. **Gynecologic Oncology**, v. 76(1), p. 123-5, 2000.

Kagan, HM & Li, W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. **Journal of Cellular Physiology**, v. 88(4), p. 660-72, 2003.

Kao, LC; Germeyer, A; Tulac, S; Lobo, S; Yang ,JP; Taylor, RN *et al.* Expression Profiling of Endometrium from Women with Endometriosis Reveals Candidate Genes for Disease-Based Implantation Failure and Infertility. **Endocrinology**, v. 144, p. 2870–81, 2003.

Kennedy, S; Bergqvist, A; Chapron, C; D'Hooghe, T; Dunselman, G; Greb, R *et al.* ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. **Human Reproduction**, v. 20(10), p. 2698-704, 2005.

Khorram, O & Lessey, BA. Alterations in expression of endometrial endothelial nitric oxide synthase and alpha(v)beta(3) integrin in women with endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 78(4), p. 860-4, 2002.

Kitajima, K; Kaji, Y; Imanaka, K; Hayashi, M; Kuwata, Y and Sugimura, K. Endometrioid adenocarcinoma arising from colonic endometriosis. **Clinical Radiology Extra**, v. 60, p.49-52, 2005.

Knapp, VJ. How old is endometriosis? Late 17th- and 18th-century European descriptions of the disease. **Fertility and Sterility**, v. 72(1), p. 10-4, 1999.

Kresse, H. & Schönherr, E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. **Journal of Cellular Physiology**, v. 189, p. 266–74, 2001.

Kyama, CM; Debrock, S; Mwenda, JM and D'Hooghe, TM. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. **Reproductive biology and endocrinology**, 2003 (<http://www.rbej.com/content/1/1/123>).

Kyama, CM; Overbergh, L; Debrock, S; Valckx, D; Perre, SV; Meuleman, C *et al.* Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 85(6), p. 1667-75, 2006.

Lissalde-Lavigne, G; Cochery-Nouvellon, E; Mercier, E; Quere, I; Dauzat, M; Mares P *et al.* The association between hereditary thrombophilias and pregnancy loss. **Haematologica**; v. 90, p. 1223-30, 2005.

Liu, X; Zhao, Y; Gao, J; Pawlyk, B; Starcher, B and Spencer, JA *et al.* Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. **Nature Genetics**, v. 36(2), p. 178-82, 2004.

Livak, KJ & Schmittgen, TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402–8, 2001.

Marcoux, S; Maheux, R, & Berube, S. Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. Canadian Collaborative Group on Endometriosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 337(4), p. 217-22, 1997.

Martelli, M; Campana, A & Bischof, P. Secretion of matrix metalloproteinases by human endometrial cells in vitro. **Journal of Human Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 67-76, 1993.

Matalliotakis, IM; Vassiliadis, S; Goumenou, AG; Athanassakis, I; Koumantakis, GE; Neonaki, MA *et al.* Soluble ICAM-1 levels in the serum of endometriotic patients appear to be independent of medical treatment. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 51(1), p. 9-19, 2001.

Mercorio, F; Mercorio, A; Sardo, ADS; Votino, C; Barba, GV and Nappi, C. Cervical fetal fibronectin as a predictor of first trimester pregnancy outcome in unexplained recurrent miscarriage. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 126(2), p. 165-9, 2006.

Metz, CE. Basic principles of ROC analysis. **Seminars in nuclear medicine**, v. 8(4), p. 283-98, 1978.

Mok, SC; Chan, WY; Wong, KK; Muto, MG and Berkowitz, RS. SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells. **Oncogene**, v. 12, p. 1895–1901, 1996.

Mounsey, AL; Wilgus, A & Slawson DC. Diagnosis and management of endometriosis. **American Family Physician**, v. 74(4), p. 594-600, 2006.

[Nagata, T](#); [Takahashi, Y](#); [Ishii, Y](#); [Asai, S](#); [Sugahara, M](#); [Nishida, Y](#) *et al.* Profiling of genes differentially expressed between fetal liver and postnatal liver using high-density oligonucleotide DNA array. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 11(6), p. 713-21, 2003.

Nap, AW; Groothuis, PG; Demir AY; Evers, JLH and Dunselman, GAJ. Pathogenesis of endometriosis. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 18(2), p. 233-44, 2004.

Nisolle, M & Donnez, J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. **Fertility and Sterility**, v. 68, p. 585-96, 1997.

O'Callaghan, D. Endometriosis - an update. **Australian Family Physician**, v. 35(11), p. 864-7, 2006.

Oka, C; Tsujimoto, R; Kajikawa, M; Koshiba-Takeuchi, K, Ina, J; Yano, M *et al.* HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by TGF- β family proteins. **Development**, v. 131, p. 1041–53, 2004.

Oosterlynck, DJ; Cornillie, FJ; Waer, M; Vandeputte, M and Koninckx, PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. **Fertility and Sterility**, v. 56(1), p. 45-51, 1991.

Parry, L; Lopez-Ballester, J; Wiest, L and Pegg, AE. Effect of expression of human spermidine/spermine N1-acetyltransferase in Escherichia coli. **Biochemistry**, v. 34, p. 2701–9, 1995.

Pledge, A; Huang, Y; Hacker, A; Zhang, Z; Woster, PM; Davidson, NE *et al.* Spermine oxidase SMO(PAOh1), Not N1-acetylpolyamine oxidase PAO, is the primary source of cytotoxic H₂O₂ in polyamine analogue-treated human breast cancer cell lines. **The Journal of biological chemistry**, v. 280(48), p. 39843-51, 2005.

Poliness, AE; Healey, MG; Brennecke, SP and Moses, EK. Proteomic approaches in endometriosis research. **Proteomics**, v. 4, p 1897-1902, 2004.

Poncelet, AC & Schnaper, HW. Regulation of human mesangial cell collagen expression by transforming growth factor- β 1. **American Journal of Physiology**, v. 275, p. 458–66, 1998.

Popovici, RM; Betzler, NK, Krause, MS; Luo, M; Jauckus, J; Germeyer, A *et al.* Gene expression profiling of human endometrial-trophoblast interaction in a coculture model. **Endocrinology**, v. 147(12), p. 5662-75, 2006.

Prowse, AH; Fakis, G; Manek, S; Churchman, M; Edwards, S; Rowan, A *et al.* Allelic loss studies do not provide evidence for the "endometriosis-as-tumor" theory. **Fertility and Sterility**, v. 83(1), p. 1134-43, 2005.

Puri, CP; Katkam, RR; Sachdeva, G; Patil, V; Manjramkar, DD and Kholkute, SD. Endometrial contraception: modulation of molecular determinants of uterine receptivity. **Steroids**, v. 65, p. 783-94, 2000.

Redwin, DB. Was Sampson wrong? **Fertility and Sterility**, v 78(4):686-93, 2002.

Regidor, PA; Vogel, C; Regidor, M; Schindler, AE and Winterhager, E. Expression pattern of integrin adhesion molecules in endometriosis and human endometrium. **Human Reproduction Update**, v. 4(5), p. 710-8, 1998.

Ren, C; Yang, G; Timme, TL; Wheeler, TM and Thompson, TC. Reduced lysyl oxidase messenger RNA levels in experimental and human prostate cancer. **Cancer Research**, v. 58, p. 1285–90, 1998.

Rost, T; Pyritz, V; Rathcke, IO; Gorogh, T; Dunne, AA and Werner, JA. Reduction of LOX- and LOXL2-mRNA expression in head and neck squamous cell carcinomas. **Anticancer Research**, v. 23, p. 1565–73, 2003.

Roughley, PJ, & Lee, ER. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. **Microscopy Research and Technique**, v. 28(5), p. 385-97, 1994.

Said, N & Motamed, K. Absence of host-secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) augments peritoneal ovarian carcinomatosis. **American Journal of Pathology**, v. 167(6), p. 1739-52, 2005.

Schiemann, BJ; Neil, JR & Schiemann, WP. SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor- β -signaling system. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, p. 3977–88, 2003.

Semino, C; Semino, A; Pietra, G; Mingari, MC; Barocci, S; Venturini, PL *et al.* Role of major histocompatibility complex class I expression and natural killer-like T cells in the genetic control of endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 64(5), p. 909-16, 1995.

Sharpe-Timms, KL. Basic research in endometriosis. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 24, p. 269–90, 1997.

Sharpe-Timms, KL. Endometrial Anomalies in Women with Endometriosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 943, p. 131-47, 2001.

Sillem, M; Prifti, S; Neher, M and Runnebaum, B. Extracellular matrix remodelling in the endometrium and its possible relevance to the pathogenesis of endometriosis. **Human Reproduction Update**, v. 4(5), p. 730-5, 1998.

Simpson, JL & Bischoff, FZ. Heritability and molecular genetic studies of endometriosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 955, p. 239-51, 2002.

Spaczynski, RZ & Duleba, AJ. Diagnosis of endometriosis. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 21(2), p. 193-208, 2003.

Strowitzki, T; Germeyer, A; Popovici, R and von Wolff, M. The human endometrium as a fertility-determining factor. **Human Reproduction Update**. v. 12(5), p.617-30, 2006.

Swiersz, LM. Role of endometriosis in cancer and tumor development. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v 955, p. 281–92, 2001.

Taylor, RN; Lundeen,SG & Giudice, LC. Emerging role of genomics in endometriosis research. **Fertility and Sterility**, v. 78(4), p. 694-8, 2002.

Tocharus, J; Tsuchiya, A; Kajikawa, M; Ueta Y; Oka, C and Kawaichi, M. Developmentally regulated expression of mouse HtrA3 and its role as an inhibitor of TGF-beta signaling. **Development, Growth & Differentiation**, v 46(3), p. 257-74, 2004.

Triola, MF. *Statdisk 9.1 for Elementary Statistics*. 9 ed., Pearson Education, 2005.

Tsuchiya, A; Yano, M; Tocharus, J; Kojima, H; Fukumoto, M; Kawaichi M *et al*. Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. **Bone**, 2005 v. 37(3), p. 323-36.

Tummon, IS; Asher, LJ; Martin, JS and Tulandi, T. Randomized controlled trial of superovulation and insemination for infertility associated with minimal or mild endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 68, p. 8–12, 1997.

Vernet-Tomás, MM; Perez-Ares, CT; Verdu, N; Fernandez-Figueras, MT; Molinero JL and Carreras, R. The depolarized expression of the alpha-6 integrin subunit in the

endometria of women with endometriosis. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 13(4), p. 292-6, 2006.

Viganò, P; Somigliana, E; Chiodo, I; Abbiati, A and Vercellini, P. Molecular mechanisms and biological plausibility underlying the malignant transformation of endometriosis: a critical analysis. **Human Reproduction Update**, v. 12(1), p. 77-89, 2006.

Wenzl, RJ & Heinzl, H. Localization of matrix metalloproteinase-2 in uterine endometrium and ectopic implants. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 45(4), p. 253-7, 1998.

Wingfield, M; Macpherson, A; Healy DL and Rogers PA. Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 64(2), p. 340-6, 1995.

Wu, G; Guo, Z; Chang, X; Kim, MS; Nagpal, JK, and Liu, J. LOXL1 and LOXL4 Are Epigenetically Silenced and Can Inhibit Ras/Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathway in Human Bladder Cancer. **Cancer Research**, v. 67(9), p. 4123-9, 2007.

Wu, MH; Shoji, Y; Wu, MC; Chuang, PC; Lin, CC; Huang, MF *et al.* Suppression of matrix metalloproteinase-9 by prostaglandin E(2) in peritoneal macrophage is associated with severity of endometriosis. **The American Journal of Pathology**, v. 167(4), p. 1061-9, 2005.

Yang, W-C V; Chen, H-W; Au, H-K; Chang, C-W; Huang, C-T; Yen, Y-H *et al.* Serum and endometrial markers. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 18 (2), p. 177-200, 2004.

Yiu, GK; Chan, WY; Ng, SW; Chan, PS; Cheung, KK; Berkowitz, RS *et al.* SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. **American Journal of Pathology**, v. 159, p. 609–622, 2001.

Zanetta, GM; Webb, MJ; Li, H and Keeney, GL. Hyperestrogenism: a relevant risk factor for the development of cancer from endometriosis. **Gynecologic Oncology**, v. 79(1), p. 18-22, 2000.

Zeitoun, KM & Bulun, SE. Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis. **Fertility and Sterility**, v 72, p 961-9, 1999.

Zumbrunn, J & Trueb, B. Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. **FEBS Letters**, v. 398, p. 187–92, 1996.

Zweig, MH & Campbell, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. **Clinical Chemistry**, v. 39(4), p. 561-77. Erratum in: **Clinical Chemistry**, v. 39(8), p. 1589, 1993.

ANEXO A

Sequências consideradas contaminantes obtidas das bibliotecas RHENDI e RHENDW

Bactérias		RHENDI	RHENDW
U00096	Escherichia coli K-12 MG1655 complete genome	37	5
Total		37	5
Leveduras		RHENDI	RHENDW
T38386	T38386 EST103859 Saccharomyces cerevisiae cDNA 3' end. 1/95		4
Total		0	4
Outros		RHENDI	RHENDW
ZP_00377153	TonB-dependent receptor [Erythrobacter litoralis HTCC2594]	1	
ZP_00302656	COG0346: Lactoylglutathione lyase and related lyases [Novosphingobium aromaticivorans DSM 12444]	1	
ZP_00304057	COG1506: Dipeptidyl aminopeptidases/acylaminoacyl-peptidases [Novosphingobium aromaticivorans DSM 12444]	1	
AAA36590	ORF1; putative	1	
Total		4	0
Total de contaminantes		41	9

ANEXO B

Sequências de RNA das categorias: mitocondrial, ribossômica, ESTs e Unigene

Mitocondrial		RHENDI	RHENDW
J01415	Human mitochondrion, complete genome	368	19
Total		368	19
Ribossômica		RHENDI	RHENDW
U09953	gp U09953 1323733 E3F957CA13F7BFEF ribosomal protein L9 [Homo sapiens]		22
AB007158	gp AB007158 3088342 E6A62203E15257C1 ribosomal protein S23 [Homo sapiens]		1
M90054	gp M90054 337580 E9F238D9F8CA0D67 ribosomal protein L3 [Homo sapiens]		5
BC000802	tn BC000802 AAH00802 E9CE3CBD59524F81 Similar to ribosomal protein S9.[Homo sapiens]		2
BC000523	tn BC000523 AAH00523 E0764D60A6DD576E Similar to ribosomal protein S24.[Homo sapiens]		1
U14966	gp U14966 550013 25F3BC2C6F674442 ribosomal protein L5 [Homo sapiens]		1
AF348700	tn AF348700 AAK31162 2FE469F736571002 (UBA52)Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 (Fragment).[Homo sapiens]		5
X69391	gp X69391 36138 3E209D02DFF365D9 ribosomal protein L6 [Homo sapiens]		14
XM_371853	PREDICTED: Homo sapiens similar to 60S ribosomal protein L27a (LOC389435), mRNA		16
NM_000979	Homo sapiens ribosomal protein L18 (RPL18), mRNA		2
NM_001002	Homo sapiens ribosomal protein, large, P0 (RPLP0), transcript variant 1, mRNA		4
NM_001012	Homo sapiens ribosomal protein S8 (RPS8), mRNA		2
NM_000661	Homo sapiens ribosomal protein L9 (RPL9), mRNA		3
NM_002952	Homo sapiens ribosomal protein S2 (RPS2), mRNA		1
NM_000992	Homo sapiens ribosomal protein L29 (RPL29), mRNA		5
NM_006013	Homo sapiens ribosomal protein L10 (RPL10), mRNA		3
NM_022551	Homo sapiens ribosomal protein S18 (RPS18), mRNA		2

continua

continuação

NM_000998	Homo sapiens ribosomal protein L37a (RPL37A), mRNA	4
NM_007104	Homo sapiens ribosomal protein L10a (RPL10A), mRNA	1
NM_000970	Homo sapiens ribosomal protein L6 (RPL6), mRNA	4
NM_000991	Homo sapiens ribosomal protein L28 (RPL28), mRNA	2
NM_033022	Homo sapiens ribosomal protein S24 (RPS24), transcript variant 1, mRNA	1
NM_001009	Homo sapiens ribosomal protein S5 (RPS5), mRNA	13
NM_001007074	Homo sapiens ribosomal protein L32 (RPL32), transcript variant 3, mRNA	1
NM_000981	Homo sapiens ribosomal protein L19 (RPL19), mRNA	6
NM_001021	Homo sapiens ribosomal protein S17 (RPS17), mRNA	47
NM_001015	Homo sapiens ribosomal protein S11 (RPS11), mRNA	11
Total		0 179
ESTs	RHENDI	RHENDW
BE078764	QV2-BT0619-160400-144-f07_1 BT0619 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence	1
CN288604	17000583181938 GRN_PRENEU Homo sapiens cDNA 5', mRNA sequence	1
AW063430	TN0915 KRIBB Human TN intrathymic T-cell cDNA library Homo sapiens cDNA 3', mRNA sequence	2
AW023412	df54e06.y1 Morton Fetal Cochlea Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2487251 5', mRNA sequence	1
AW166933	xg68e10.x1 NCI_CGAP_Ut4 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2633514 3' similar to TR:P97365 P97365 ZINC FINGER PROTEIN 64 ;, mRNA sequence	1
DA513180	DA513180 FEBRA2 Homo sapiens cDNA clone FEBRA2000391 5', mRNA sequence	1
BF979590	602288061F1 NIH_MGC_97 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4373847 5', mRNA sequence	1
AU120065	AU120065 HEMBA1 Homo sapiens cDNA clone HEMBA1007256 5', mRNA sequence	1

continua

continuação

CF597202	AGENCOURT_15657637 NICHHD_Hs_Ov1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:30705289 5', mRNA sequence	5
BX402096	BX402096 Homo sapiens NEUROBLASTOMA COT 25-NORMALIZED Homo sapiens cDNA clone CS0DC012YB18 3- PRIME, mRNA sequence	2
CB999662	AGENCOURT_13652348 NIH_MGC_186 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:30323605 5', mRNA sequence	1
AA253227	zr76b03.s1 Soares_NhHMPu_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:669293 3', mRNA sequence	1
CR737055	CR737055 Soares_pregnant_uterus_NbHPU Homo sapiens cDNA clone IMAGp998B211198 ; IMAGE:502196 5', mRNA sequence	1
AA586724	nn67c06.s1 NCI_CGAP_Lar1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1088938 3' similar to contains Alu repetitive element;contains MER27.b2 MER27 repetitive element ;, mRNA sequence	1
AI906423	RC-BT108-140399-075 BT108 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence	1
CN284794	17000531650825 GRN_ES Homo sapiens cDNA 5', mRNA sequence	1
BU570422	AGENCOURT_10401461 NIH_MGC_82 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6618678 5', mRNA sequence	1
AA174078	zp18g12.s1 Stratagene fetal retina 937202 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:609862 3', mRNA sequence	1
AA176858	zp10c01.r1 Stratagene fetal retina 937202 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:609024 5' similar to contains Alu repetitive element;contains element THR repetitive element ;, mRNA sequence	1
BE439881	HTM1-470F HTM1 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence	3
CV572711	od27h01.y1 Human keratoconus cornea, unamplified, (od/oe) Homo sapiens cDNA clone od27h01 5', mRNA sequence	1
DA160554	DA160554 BRAMY2 Homo sapiens cDNA clone BRAMY2020574 5', mRNA sequence	1

continua

continuação

CV571660	oe15f10.y1 Human keratoconus cornea, unamplified, (od/oe) Homo sapiens cDNA clone oe15f10 5', mRNA sequence	2
BI463414	603204458F1 NIH_MGC_97 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5269982 5', mRNA sequence	1
CX783776	HESC3_25_H02.g1_A036 NIH_MGC_260 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:7478237 5', mRNA sequence	1
CV427484	RC6-FN0082-271000-021-E10 FN0082 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence	1
DA627771	DA627771 KIDNE2 Homo sapiens cDNA clone KIDNE2008378 5', mRNA sequence	1
Total		28 8
Unigene		RHENDI RHENDW
AK131511	tgnl UG Hs#S19862974 Homo sapiens cDNA FLJ16729 fis, clone UTERU3017176 /cds=p(3512,3913) /gb=AK131511 /gi=47077535 /ug=Hs.544147 /len=3913	4
AK125512	tgnl UG Hs#S16887192 Homo sapiens cDNA FLJ43524 fis, clone PLACE5000297 /gb=AK125512 /gi=34531632 /ug=Hs.369042 /len=3591	2
DB275414	tgnl UG Hs#S29666869 DB275414 UTERU3 Homo sapiens cDNA clone UTERU3000431 5', mRNA sequence /clone=UTERU3000431 /clone_end=5' /gb=DB275414 /gi=83216722 /ug=Hs.586927 /len=570	1
AK024881	tgnl UG Hs#S2652760 Homo sapiens cDNA: FLJ21228 fis, clone COL00739, mRNA sequence /gb=AK024881 /gi=10437293 /ug=Hs.306716 /len=1869	1
BG818416	tgnl UG Hs#S3604358 602779974F2 NCI_CGAP_Brn67 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4915530 5', mRNA sequence /clone=IMAGE:4915530 /clone_end=5' /gb=BG818416 /gi=14166003 /ug=Hs.434023 /len=744	1
AF370457	tgnl UG Hs#S15632048 Homo sapiens ovarian epithelial carcinoma-related protein mRNA, complete cds /cds=p(3715,4461) /gb=AF370457 /gi=30314934 /ug=Hs.131226 /len=4737	1

continua

continuação

CA313852	tgnl UG Hs#S6103412 UI-CF-FN0-afo-g-20-0-UI.s1 UI-CF-FN0 Homo sapiens cDNA clone UI-CF-FN0-afo-g-20-0-UI 3', mRNA sequence /clone=UI-CF-FN0-afo-g-20-0-UI /clone_end=3' /gb=CA313852 /gi=24531950 /ti=159720155 /ug=Hs.574529 /len=760	1
AK022877	tgnl UG Hs#S2650933 Homo sapiens cDNA FLJ12815 fis, clone NT2RP2002546, mRNA sequence /gb=AK022877 /gi=10434526 /ug=Hs.49476 /len=2267	1
BQ924623	tgnl UG Hs#S4693338 AGENCOURT_8821514 Lupski_sciatic_nerve Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6203471 5', mRNA sequence /clone=IMAGE:6203471 /clone_end=5' /gb=BQ924623 /gi=22339654 /ti=141988287 /ug=Hs.573780 /len=963	2
XM_496387	tgnl UG Hs#S21591497 PREDICTED: Homo sapiens similar to tripartite motif-containing 43 (LOC440610), mRNA /cds=p(1,1701) /gb=XM_496387 /gi=51459269 /ug=Hs.497543 /len=1774	2
NM_014643	tgnl UG Hs#S2140692 KIAA0222 gene product [Homo sapiens], mRNA sequence /cds=(318,3809) /gb=Nm_014643 /gi=7662009 /ug=Hs.48450 /len=6033	1
NM_017737	tgnl UG Hs#S2293714 hypothetical protein FLJ20275 [Homo sapiens], mRNA sequence /cds=(54,1046) /gb=Nm_017737 /gi=8923248 /ug=Hs.239681 /len=3320	1
N23897	tgnl UG Hs#S321444 yw46h10.s1 Weizmann Olfactory Epithelium Homo sapiens cDNA clone IMAGE:255331 3', mRNA sequence /clone=IMAGE:255331 /clone_end=3' /gb=N23897 /gi=1138047 /ug=Hs.144186 /len=454	1
BX641141	tgnl UG Hs#S16819731 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686N19169 (from clone DKFZp686N19169) /gb=BX641141 /gi=34365471 /ug=Hs.449601 /len=3129	1

continua

continuação

BM141654	tgnl UG Hs#S3994991 if24c05.x1 Melton Normalized Human Islet 4 N4-HIS 1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5677424 3', mRNA sequence /clone=IMAGE:5677424 /clone_end=3' /gb=BM141654 /gi=17151719 /ug=Hs.571918 /len=543	3	
AL833386	tgnl UG Hs#S4622005 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp667N0414 (from clone DKFZp667N0414), mRNA sequence /gb=AL833386 /gi=21734021 /ug=Hs.376868 /len=3219	1	
XM_498786	PREDICTED: Homo sapiens LOC440642 (LOC440642), mRNA	2	
BG941030	tgnl UG Hs#S3751839 ax08h09.y1 Proliferating Human Erythroid Cells (LCB:ax library) Homo sapiens cDNA clone ax08h09 random, mRNA sequence /clone=ax08h09 /gb=BG941030 /gi=14340402 /ug=Hs.574458 /len=272	1	
Total		22	5