UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

JULIANA MEOLA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM
ENDOMETRIOSE

Ribeirão Preto
2008

JULIANA MEOLA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM ENDOMETRIOSE.

[DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION ANALYSIS IN ENDOMETRIOSIS].

Tese apresentada ao Departamento de
Genética da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor
em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Genética
Orientadora: Prof^a Dr^a. Lúcia Regina
Martelli

Ribeirão Preto
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Meola, Juliana

Análise da Expressão Gênica Diferencial em Endometriose / Juliana Meola;
orientadora: Prof^a Dr^a Lúcia Regina Martelli. Ribeirão Preto, São Paulo,
2008.

132p.: il. ; 30cm

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Genética. Área de
Concentração: Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo.

1. Endometriose, 2. Expressão Gênica Diferencial, 3. Endométrio, 4. Hibridação
Subtrativa , 5. PCR em Tempo Real.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Meola

Análise da Expressão Gênica Diferencial em Endometriose.

Tese apresentada ao Departamento de
Genética da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovado em:

Área de concentração: Genética

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*" As verdades científicas
serão sempre paradoxais,
se julgadas pela experiência
de todos os dias,
a qual somente capta a aparência
enganadora das coisas."
Karl H. Marx (1898).*

Dedico...

.....A Deus,

*por caminhar comigo em todos os momentos,
até mesmo naqueles em que eu não consegui perceber sua
presença.*

.... aos meus pais amados,

que são responsáveis por tudo que sou.

.....aos meus irmãos,

pelo carinho e compreensão.

.....ao meu namorado,

*pelo incentivo, amor, amizade e acima de
tudo pelo companheirismo.*

....A todos os demais da minha família,

os quais amo muito....

AGRADECIMENTOS

Às pacientes, que generosamente tornaram esta pesquisa possível, o meu carinho especial.

À Prof^a. Dr^a. Lúcia Regina Martelli, agradeço pelo apoio, incentivo e confiança.

Aos membros da Banca Examinadora pelas sugestões e críticas.

Ao Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani e Dr. Júlio César Rosa e Silva, agradeço a atenção, ensinamentos e as 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 Prof^a. Dr^a. Silvana Giuliatti e ao aluno de doutorado Luciano A. S. Bernardes, do Grupo de Bioinformática (GBI), agradeço pelo suporte estatístico e a amizade.

À Prof^a Dr^a Cláudia C. Paro de Paz, agradeço pelo suporte estatístico e amizade.

À Prof^a. Dr^a. Ester S. Ramos, agradeço pelo convívio agradável e colaboração científica.

Ao Prof. Dr. Raysildo B. Lôbo pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

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

À Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria da Agricultura e Abastecimento.

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

Ao meu grupo de pesquisa Ana Carolina Laus, Daniel B. Dentillo, Fábio R. Pablos, Fernando H. Biase, Gismar Vieira, Juliana Cuzzi, Maria Silvana J. de Vozzi e Reginaldo Justino Ferreira. Em especial a minha amiga Luciana C. V. Castelli, companheira de todas as horas, inclusive as de mau humor.

Aos demais amigos e amigas do bloco C do Departamento de Genética pelas alegrias compartilhadas no dia a dia.

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 Prof^a. Dr^a. Agda Karina Brodoloni Eterovic, Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli, Prof^a. Dr^a. Rosane de Paula Gomes Queiroz e aos doutorandos Fábio Motta, Vanessa, Maria Angélica, Priscila...

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.

SUMÁRIO

RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
INTRODUÇÃO.....	1
ENDOMETRIOSE	2
ETIOLOGIA DA ENDOMETRIOSE	5
FATORES DE RISCO, ENDOMETRIOSE E CÂNCER.....	10
TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM ENDOMETRIOSE..	11
OBJETIVOS	14
MATERIAL E MÉTODOS	16
CASUÍSTICA.....	17
AMOSTRAS.....	18
ISOLAMENTO DO RNA TOTAL.....	18
RÁPIDA HIBRIDAÇÃO SUBTRATIVA DE cDNA (RASH)	18
Síntese do cDNA	19
Digestão Enzimática com <i>MboI</i> e Ligação dos Adaptadores.....	19
PCR e Purificação dos Produtos	20
Digestão do teste	20
Hibridação Subtrativa.....	20
Ligação ao plasmídeo pZErO®-1 e Transformação Bacteriana	21
Screening das Colônias e Análise por Sequenciamento	21
ANÁLISES POR BIOINFORMÁTICA.....	21
VALIDAÇÃO DOS DADOS DA RASH POR PCR EM TEMPO REAL	22
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
RESULTADOS	27
BIBLIOTECAS DE HIBRIDAÇÃO SUBTRATIVA DE cDNA (RASH)	28
VALIDAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL.....	46
DISCUSSÃO.....	50
CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS.....	73
MANUSCRITO	99

RESUMO

MEOLA, J. **Análise da expressão gênica diferencial em endometriose**. 2008. 132 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A endometriose é uma doença ginecológica benigna, de etiologia complexa e multifatorial, caracterizada pela presença de estroma e tecido glandular tipo endométrio fora da cavidade uterina. Afeta de 10 a 15% da população feminina, que apresentam sintomatologia variada, incluindo dor pélvica e infertilidade. Para elucidar mecanismos potenciais que estejam envolvidos com a fisiopatologia complexa desta doença, analisamos o perfil de expressão gênica diferencial pela metodologia de hibridação subtrativa em tecido eutópico e ectópico (lesões peritoniais e endometrioma ovariano) de 17 mulheres com endometriose, no início da fase proliferativa do ciclo menstrual. Foram identificados 291 genes desregulados nas lesões endometrióticas, considerados como genes candidatos. Para a validação dos dados, utilizamos a metodologia de PCR em tempo real para os genes *CTGF* e *SPARC*, indicados como superexpressos; e *MYC*, *MMP3*, *IGFBP1* e *PAEP* como menos expressos nas lesões. Diferenças significativas de expressão nas lesões peritoniais foram obtidas para os genes *SPARC*, *MYC*, *IGFBP1*, *PAEP* e nos endometriomas ovarianos para os genes *MMP3* e *PAEP*. Sugerimos que a desregulação dos genes *SPARC*, *MYC*, *MMP3*, *IGFBP1* e *PAEP* seja responsável pela perda da homeostase celular nas lesões endometrióticas, contribuindo para a implantação e sobrevivência do tecido ectópico no ambiente extra-uterino. Este trabalho disponibilizou ao banco de dados da literatura, 291 genes com expressão gênica diferencial em lesões endometrióticas peritoniais e ovarianas como candidatos a investigações futuras.

Palavras-chave: Endometriose, Expressão Gênica Diferencial, Endométrio, Hibridação Subtrativa, PCR em Tempo Real.

ABSTRACT

MEOLA, J. **Differential gene expression analysis in endometriosis**. 2008. 132 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Endometriosis is a benign gynecological disease, which presents a multifactorial and complex etiology, characterized by the presence of stromal and glandular endometrium tissue outside the uterine cavity. Ten to 15% of the female population is affected by the disease with a wide-ranging symptomatology including pelvic pain and infertility. To clarify the potential mechanisms involved in the complex physiopathology of this disease, we analyzed the differential gene expression profile by subtractive hybridization in eutopic and ectopic tissue (peritoneal lesions and ovarian endometriomas) from 17 women with endometriosis, in the early proliferative phase of the menstrual cycle. We identified 291 genes deregulated in the endometriotic lesions, considered as candidate genes. For data validation, Real Time PCR was applied for genes *CTGF* and *SPARC*, indicated as overexpressed; and for genes *MYC*, *MMP3*, *IGFBP1* and *PAEP*, indicated as downregulated in the lesions. Significant differences in the peritoneal lesions expression were obtained for genes *SPARC*, *MYC*, *IGFBP1*, *PAEP* and in the ovarian endometriomas for genes *MMP3* and *PAEP*. We suggest that the deregulation of genes *SPARC*, *MYC*, *MMP3*, *IGFBP1* and *PAEP* is responsible for loss of cellular homeostasis in the endometriotic lesions, contributing for the implantation and maintenance of the ectopic tissue in the extra-uterine environment. This study provided 291 genes with differential gene expression, in peritoneal and ovarian lesions, to the literature database as candidates for future investigations.

Key-words: Endometriosis, Differential Gene Expression, Endometrium, Subtractive Hybridization, Real Time PCR.

INTRODUÇÃO

ENDOMETRIOSE

A endometriose é uma doença ginecológica benigna, estrógeno-dependente, bastante agressiva, que afeta 10 a 15% das mulheres na idade reprodutiva (Thomas e Prentice, 1992; Yang *et al.*, 2004). É caracterizada pelo crescimento de estroma e tecido glandular tipo endométrio fora da cavidade uterina, denominado endométrio ectópico (Sampson, 1927; Poliness *et al.*, 2004).

O tecido ectópico é histologicamente semelhante ao endométrio normal de mulheres sem endometriose e ao endométrio normal, eutópico, de mulheres afetadas pela doença. Mas, tais tecidos diferem entre si bioquímica e funcionalmente em numerosas vias, incluindo receptividade a esteróides, potencial proliferativo e invasivo (Gaetje *et al.*, 1995; Vinatier *et al.*, 2001; Nap *et al.*, 2004; Viganò *et al.*, 2004; Ulukus *et al.*, 2006). O local mais comum de implantes endometrióticos é a cavidade pélvica, principalmente o peritônio pélvico. Podem também ser encontrados nos ovários e septo reto-vaginal, e ocasionalmente no pericárdio, pleura, fígado, rim, bexiga, cérebro e raramente em homens (Lebovic *et al.*, 2001; Giudice e Kao, 2004).

Alguns sintomas são característicos desta doença, como a dismenorréia (dor pélvica durante a menstruação), dispareunia (dor durante o ato sexual), dor pélvica não cíclica e infertilidade (Poliness *et al.*, 2004). A prevalência de endometriose entre mulheres assintomáticas é de 2 a 22%, e em mulheres com dismenorréia é de 40 a 60% (Farquhar, 2000). Além disso, 25 a 50% de mulheres inférteis apresentam endometriose e 30 a 50% de mulheres com endometriose são inférteis (D'Hooghe *et al.*, 2003). Tais porcentagens variam de acordo com os critérios de diagnóstico adotados. Evidências sugerem que esses sintomas associados com a doença resultam de uma reação inflamatória peritonal local, ocasionada pelos implantes endometriais ectópicos (Lebovic *et al.*, 2001) que sofrem sangramento cíclico (Arya e Shaw, 2005).

Mecanismos que associam endometriose com infertilidade têm sido sugeridos, como:

(1) distorção da anatomia pélvica devido a adesões endometrióticas, que poderiam prejudicar a liberação do oócito ou inibir seu transporte; (2) função peritoneal alterada em pacientes com endometriose devido ao aumento do volume do fluido peritoneal, aumento da concentração de macrófagos ativados, prostaglandinas, interleucina 1 (IL-1), TNF (*tumor necrosis factor*) e proteases. Tais alterações causariam efeitos adversos no oócito, espermatozóide e embrião (Birmingham, 2006); (3) falha de implantação devido à redução da expressão endometrial de $\alpha_v\beta$ integrinas (Lessey *et al.*, 1994) e L-selectina em mulheres com endometriose durante a fase de implantação (Genbacev *et al.*, 2003). Entretanto, a hipótese de que a doença causa infertilidade ou diminui a fecundidade permanece controversa.

O diagnóstico de endometriose inicialmente é feito com a história clínica da paciente. Entretanto, a sintomatologia variada e sua pobre correlação com a severidade da doença podem dificultar este diagnóstico (Vercellini *et al.*, 1991). Na maioria dos casos, a endometriose é cirurgicamente estadiada com base na localização, extensão e tipo de lesão por laparoscopia. Além disso, o diagnóstico final é dado pela análise histopatológica da lesão (Brosens *et al.*, 2004).

A *American Society for Reproductive Medicine* (1997) organizou e propôs a classificação da endometriose em quatro estádios: forma mínima (estádio I), leve (II), moderada (III) e severa (IV). Tal método é baseado em um sistema de escores unificados nos quatro estádios, na avaliação percentual e volume das lesões, incluindo a predição sobre a probabilidade de gravidez após o tratamento. Embora este método de classificação seja mundialmente aceito, ele pobremente prediz a chance de gravidez após terapia, devido à arbitrariedade na atribuição dos escores, que é feita de acordo com a observação de cada patologista (Birmingham, 2006).

Além desta classificação, morfológicamente os implantes peritoniais e ovarianos podem ser diferenciados em: lesões vermelhas, negras (azulada ou arroxeadas, pregueadas), e brancas (American Society for Reproductive Medicine, 1997). As lesões vermelhas são mais agressivas, ativas, elevadas, apresentando histologia semelhante ao epitélio eutópico proliferativo (Nisolle e Donnez, 1997). Além disso, acredita-se serem mais vascularizadas e com maior poder invasivo, correspondendo ao primeiro estágio de desenvolvimento da doença. Já as lesões negras, também ativas, correspondem ao estágio mais avançado da doença. As lesões brancas são menos vascularizadas, inativas, aparecem posteriormente às lesões negras e apresentam aspecto cicatricial (Nisolle *et al.*, 1993; Brosens, 1994).

Os exames complementares à laparoscopia incluem a dosagem sorológica do CA 125 e CA 19-9, exames ginecológicos, ultra-sonografia transvaginal e a ressonância magnética. Entretanto, os mesmos não são adequadamente sensíveis e específicos, sendo a laparoscopia, apesar de onerosa e invasiva, o método diagnóstico mais confiável (Thomas, 1995; Rosa e Silva, 2007). A ultra-sonografia transvaginal é confiável na detecção de endometriomas, contudo, assim como a ressonância magnética, falha em detectar endometriose ovariana e peritoniais superficiais (Brosens *et al.*, 2004). Embora os antígenos tumorais CA 125 e CA 19-9 sejam detectados em maiores concentrações no soro e no fluido peritoniais de pacientes com endometriose, sendo especificamente correlacionados com a doença, ambos apresentam baixa sensibilidade (Foster, 2003).

O tratamento adequado deve ser individualizado para cada paciente. A recomendação para tratamento medicamentoso e/ou cirúrgico depende da ausência ou presença de sintomas, grau da doença, idade da paciente e sua futura ambição de fertilidade. Geralmente, recomenda-se o tratamento cirúrgico quando há danos ovarianos e tubários, cistos endometrióticos, outras doenças ginecológicas associadas, ou quando houver falha na terapia com drogas. Já a terapia medicamentosa é mais apropriada em casos de doença recorrente ou

início de tratamento. Apenas em casos extremos indica-se a histerectomia (Thomas, 1995). A terapia com drogas padrão para a endometriose inclui: analgésicos (drogas antiinflamatórias não esteroidais), contraceptivos orais, agentes androgênicos, progestágenos e antiprogestogênicos, antigonadotrofinas e análogos do GnRH (hormônio liberador da gonadotrofina) (Mounsey *et al*, 2006). Tais medicamentos têm alcances variados, mas as funções são as mesmas, incluindo supressão da atividade ovariana, menstrual e atrofia dos implantes endometrióticos (Farquhar, 2007). Embora, os tipos de tratamentos sejam variados, a recorrência da endometriose ocorre em mais de 60% dos casos. Mesmo após terapias radicais, como a histerectomia, sua recorrência é de 5 a 10% (Arya e Shaw, 2005).

ETIOLOGIA DA ENDOMETRIOSE

Várias teorias têm sido propostas para explicar as várias localizações da endometriose. São elas:

A teoria da metaplasia celômica, primeiramente descrita em 1919 por Meyer, sugere que o epitélio celômico possa se transformar, por metaplasia em tecido tipo endométrio. Esta teoria explicaria a endometriose ovariana e foi estendida para a serosa peritonial, que tem potencial de proliferação e diferenciação (Vinatier *et al*, 2001; Arya e Shaw, 2005). Tal teoria também é atrativa para explicar a ocorrência de endometriose na ausência de menstruação (El Mahgoud e Yaseen, 1980). Entretanto, alguns fatores contrários devem ser considerados: o fato que a endometriose ocorre na maioria dos casos quando o endométrio está presente, e desta forma os homens seriam poupados da doença; a endometriose poderia ocorrer em qualquer lugar onde os tecidos são derivados de epitélio celômico; se a metaplasia celômica fosse semelhante à metaplasia comum, a frequência de endometriose seria maior com a idade (Vinatier *et al*, 2001; Nap *et al*, 2004).

A teoria de restos embrionários, proposta por Russel (1899), baseia-se na existência de células originárias do ducto de Müller com potencial de desenvolvimento em endométrio funcionante. Questiona-se tal teoria, pois a distribuição anatômica da endometriose não se relaciona com as vias dos ductos de Müller (Nap *et al.*, 2004).

Além disso, acredita-se que essas teorias possam ser vistas como complementares, pois, metaplasia e crescimento de resíduos Müllerianos podem ser induzidos experimentalmente por *debris* menstruais (Fujii, 1991). Tal descoberta corrobora com a teoria da indução, proposta por Levander e Norman em 1955. Esta teoria, que é uma extensão da teoria da metaplasia celômica, propõe que o endométrio menstrual degradado libera fatores endógenos, bioquímicos e imunológicos, que induzem a metaplasia do epitélio seroso do ovário e as células serosas do mesotélio, resultando em tecido endometrial (Arya e Shaw, 2005).

A teoria da implantação metastática ou teoria de Sampson (1927) propõe que, durante a menstruação haja um refluxo de tecido endometrial via tuba uterina para dentro da cavidade abdominal, onde este tecido poderia implantar. Vários fatores corroboram para esta teoria, que é a mais aceita para explicar a origem da endometriose. São eles: o fluxo menstrual retrógrado ocorre em 90% das mulheres (Halme *et al.*, 1984); a presença de células epiteliais endometriais viáveis no fluido peritônio (Kruitwagen *et al.*, 1991), ou seja, as células endometriais têm características de adesão, implantação, crescimento e angiogênese (Viganò *et al.*, 2004); e a associação entre fluxo menstrual obstruído e endometriose (Olive e Henderson, 1987).

Entretanto, é importante salientar que apenas o refluxo tubário não é suficiente para estabelecer a doença, pois, 90% das mulheres possuem menstruação retrógrada e apenas 10 a 15% desenvolvem endometriose. Assim sendo, após a disseminação das células menstruais, alguns estágios são necessários para o estabelecimento e manutenção da doença, como:

1) ESCAPE DO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Acredita-se que a patogênese da doença está associada com a capacidade das células endometriais ectópicas de neutralizar a resposta imune local, devido a defeitos no sistema de vigilância imunológica e supressão de células do sistema imune (Lebovic *et al.*, 2001; Siristatidis *et al.*, 2006). Algumas alterações em mulheres com endometriose têm sido demonstradas como: a modificação na expressão de antígenos do sistema HLA (*human lymphocyte antigen*) de classe I, que são relevantes no reconhecimento imune (Semino *et al.*, 1995); a diminuição da atividade de NK (*natural killer*) e citotoxicidade contra as células endometriais ectópicas (Oosterlynck *et al.*, 1991); a secreção de fatores como TGF- β (*transforming growth factor*) e prostaglandina E2 que inibem as funções dos linfócitos (Hirata *et al.*, 1994).

2) MECANISMOS DE ADESÃO:

As moléculas de adesão, como integrinas e caderinas, são as principais mediadoras da adesão célula-célula e célula-matriz celular, e sua expressão é importante para a adesão celular inicial de tecidos que sofrem descamação (Beliard *et al.*, 1997). Algumas moléculas de adesão como as integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e E-caderina são expressas em lesões endometrióticas, podendo estar associadas com a doença (Witz, 2003).

3) MECANISMOS DE INVASÃO:

O mecanismo de invasão pelo tecido ectópico é dependente de metaloproteases da matriz (MMP) e de seus inibidores teciduais específicos (TIMPs). As MMPs têm funções importantes no controle de mudanças cíclicas do endométrio, na proliferação e inibição de crescimento, além disso, são reguladas por estrógeno e progesterona (Rodgers *et al.*, 1994). A síntese e secreção desregulada de MMPs por lesões endometrióticas, combinada com

aberrantes quantidades de TIMPs no fluido peritonal, podem alterar o ambiente proteolítico normal da cavidade peritonal, induzindo um ambiente mais agressivo e facilitando a invasão das células ectópicas (Viganò *et al.*, 2004).

4) MECANISMOS DE APOPTOSE

A morte celular programada, comumente conhecida como apoptose, é um processo fisiológico responsável pela manutenção da homeostase celular durante o ciclo menstrual. Ela elimina as células senescentes da camada funcional do endométrio uterino durante a fase secretora tardia do ciclo menstrual, substituindo-as por células novas durante a fase proliferativa do ciclo. Contudo, em mulheres com endometriose a porcentagem de células que passa por apoptose é menor, indicando que algumas células podem continuar a exibir atividades fisiológicas errôneas (Dmowski *et al.*, 2001). Várias moléculas regulam a apoptose como p53, Bax (*BCL2-associated X protein*) e c-myc (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*) que estimulam a morte celular programada, e Bcl-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) e Bcl-xL (*BCL2-like 1*) que inibem a apoptose (Sattler *et al.*, 1997; Harada *et al.*, 2004). O aumento da Bcl-2 já foi demonstrado em pacientes afetadas por Meresman e colaboradores (2000).

5) NEOVASCULARIZAÇÃO

A vascularização dos implantes endometrióticos é provavelmente um dos mais importantes fatores no processo de sobrevivência e invasão de outros tecidos. O ambiente peritoneal é altamente angiogênico e o aumento na atividade e nas quantidades do VEGF-A (*vascular endothelial growth factor*) foi demonstrado no fluido peritonal e no endométrio de mulheres com endometriose (Donnez *et al.*, 1998). Além disso, outros fatores angiogênicos, incluindo interleucinas 1, 6 e 8, EGF (*epidermal growth factors*), IGF (*insulin-like growth*

factors) e Endo-I são reconhecidamente expressos pelo endométrio eutópico e ectópico em pacientes com endometriose (Taylor *et al.*, 2001; Laschke e Menger, 2007).

6) PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS ECTÓPICAS

A endometriose requer estrógeno para continuar proliferando e tende a regredir quando é privada deste hormônio. A aromatase é uma enzima que cataliza a biosíntese de estrógeno. Considerando que a expressão de aromatase é alta em cistos endometrióticos e implantes endometriais extra-ovarianos, sugere-se que esta expressão aberrante esteja envolvida na patogênese da doença, pois é um estímulo de crescimento independente do ovário (Zeitoun e Bulun, 1999). Junto com hormônios esteróides, fatores de crescimento específicos parecem favorecer a proliferação dos implantes endometrióticos (Taylor *et al.*, 2001).

Considerando as diferentes origens possíveis, localizações e respostas hormonais, foi sugerido que a endometriose peritoneal, o endometrioma ovariano e os nódulos adenomióticos do septo reto-vaginal seriam três entidades distintas com diferentes patogêneses (Nisolle e Donnez, 1997). Entretanto existem controvérsias, pois Viganò e colaboradores (2004) descreveram dados patológicos, cirúrgicos e epidemiológicos que consistentemente sugeriam que as lesões peritoniais, ovarianas e profundas constituíam diferentes expressões de uma mesma doença, com um único mecanismo patogênico, isto é, a menstruação retrógrada.

Devido às várias teorias apresentadas sobre a patogênese da endometriose e dados ainda não conclusivos sobre sua origem, sua etiologia é considerada complexa e multifatorial, sendo que as teorias propostas devem ser complementares e não exclusivas.

FATORES DE RISCO, ENDOMETRIOSE E CÂNCER

Alguns estudos sugerem aumento da incidência da endometriose durante a idade reprodutiva, sendo rara antes da menarca e com tendência a diminuir depois da menopausa (Houston, 1984). Assim sendo, mulheres com menarca precoce ou menopausa tardia têm risco aumentado de desenvolver a doença, enquanto que mulheres que fazem uso de contraceptivos orais apresentam risco diminuído (Farquhar, 2007). Também se sugere que mulheres com ciclos menstruais curtos e intensos, ou nulíparas, tenham maior risco de desenvolver a doença (Darrow *et al.*, 1993; Vercellini *et al.*, 1997; Missmer e Cramer, 2003). Entretanto, outros fatores de risco como classe social, raça, alto índice de massa corpórea, uso de álcool, tabaco e cafeína são considerados pouco consistentes (Viganò *et al.*, 2004).

Acredita-se que a endometriose tenha tendência familiar, poligênica e multifatorial, sendo observado maior risco da doença, de 5 a 8%, em mulheres com histórico familiar positivo em parentes de primeiro grau (Bischoff e Simpson, 2004). Além disso, estudos de ligação e em gêmeos têm identificado vários genes candidatos com potencial biológico plausível envolvido com a suscetibilidade para a doença, como genes supressores tumorais (*PTEN* - *phosphatase and tensin homolog*, *TP53* - *tumor protein p53*), receptores de estrógeno, progesterona e andrógeno entre outros (Giudice e Kao, 2004). Outros genes polimórficos vêm sendo associados à endometriose como *GALT* (*galactose-1-phosphatase*), *NAT2* (*N-acetyl transferase 2*), *CYP1A1* (*cytochrome P450 1A1*) e *GSTM1* (*glutathione-S-transferase M1*) (Bischoff e Simpson, 2004).

Há também relatos de algumas alterações genômicas detectadas por CGH (*comparative genomic hybridization*) e CGH array em pacientes com endometriose, que poderiam estar associadas ao desenvolvimento da doença (Gogusev *et al.*, 1999; Gogusev *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2004). O microambiente ovariano e o ambiente peritonal podem estar também relacionados a essas alterações (Koninckx *et al.*, 1998).

Embora alguns dados sugiram aumento de risco de câncer ovariano em mulheres com endometriose, as evidências biológicas que confirmem a presença da doença como condição pré-neoplásica são insuficientes. Enquanto a endometriose exibe alguns aspectos de malignidade tais como aumento de crescimento, vascularização e invasão tecidual, características tumorais como expansão monoclonal e anomalias genéticas, permanecem indefinidas. (Viganò *et al.*, 2006). Achados histológicos indicam uma associação entre endometriose e carcinoma de células claras de ovário e carcinoma endometrióide (Vercellini *et al.*, 1993). Estima-se que 1% dos casos de endometriose está relacionado ao câncer, e que 88,4% dos casos de câncer relacionados à endometriose são carcinomas, enquanto apenas 11,6% são sarcomas (Heaps *et al.*, 1990). Estudos experimentais em camundongos indicam os genes *Pten* e *K-ras* (*v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*) como envolvidos no desenvolvimento de endometriose e/ou carcinoma endometrióide ovariano (Dinulescu *et al.*, 2005).

TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM ENDOMETRIOSE

Alguns estudos visam detectar o perfil de expressão gênica diferencial em lesões endometrióticas, bem como nos tecidos eutópicos de mulheres com e sem endometriose. Eyster *e colaboradores* (2002) usaram a técnica de *microarray* para comparar endométrio eutópico e implantes endometrióticos de três pacientes na fase proliferativa do ciclo menstrual, identificando genes do citoesqueleto e com funções no sistema imune como diferencialmente expressos. Outra publicação comparou o perfil de expressão em endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose na fase secretora do ciclo menstrual, identificando moléculas como interleucinas (IL)-1 β e IL-6, TNF e VEGF como desreguladas na endometriose (Giudice *et al.*, 2001). Paralelamente a este trabalho, Kao e colaboradores compararam o endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose, mas na “janela de

implantação” (2003). Neste trabalho, os dados foram divididos em três grupos: grupo 1, onde os genes que são superexpressos normalmente na “janela de implantação” encontram-se menos expressos em mulheres com endometriose; grupo 2, onde genes normalmente menos expressos têm expressão aumentada em mulheres com a doença; e grupo 3, onde genes menos expressos no tecido normal têm expressão ainda menor no tecido eutópico das pacientes com endometriose. Outra publicação descreveu o perfil de expressão comparando endometriose ovariana com tecido eutópico das mesmas pacientes nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual (Arimoto *et al.*, 2003). Matsuzaki e colaboradores (2005) compararam endométrio normal de mulheres sem endometriose com lesões endometrióticas profundas também nas fases proliferativa e secretora. Esses trabalhos utilizaram a técnica de *microarray* de cDNA, o que representa um problema, pois os *microarrays* tipicamente usam *chips* comerciais fabricados com outras finalidades que não estudos direcionados à doença em investigação (Bischoff e Simpson, 2004). Paralelamente, os genes analisados são pré-determinados, dificultando o *screening* completo e característico das lesões.

Técnicas de *screening* que poderiam contornar este problema incluem as bibliotecas de SH (*Subtraction Hybridization*), as bibliotecas de SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), RDA (*Representational Difference Analysis*) entre outras (Jiang e Fisher, 1993; Hubank e Schatz, 1994; Velculescu *et al.*, 1995). As bibliotecas de hibridação subtrativa são bibliotecas de cDNAs derivadas de dois grupos celulares distintos, onde um deles é representado em excesso durante a hibridação subtrativa. Tal técnica permite isolar cDNAs que são representativos apenas de um dos dois grupos analisados (Taylor *et al.*, 2002). A técnica de RaSH (*Rapid Subtraction Hybridization*), descrita por Jiang e colaboradores (2000), é uma metodologia simplificada de hibridação subtrativa, que consiste na digestão enzimática de cDNAs de dupla fita em pequenos fragmentos, ligados a adaptadores e amplificados por PCR, seguido de incubação dos fragmentos de PCR *tester* com excesso de

fragmentos *driver* para hibridação e subtração. Hu *e colaboradores* (2006) usaram a metodologia de hibridação subtrativa para comparar o perfil de expressão gênica entre tecido ectópico de lesões peritoniais e tecido eutópico das mesmas mulheres nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual. Eles identificaram 14 possíveis candidatos com importante função na patogênese da endometriose.

Mudanças na expressão gênica em determinado momento são determinantes em processos fisiológicos normais e anormais. Explicar os mecanismos relacionados à fisiopatologia complexa da endometriose, buscando esclarecer o perfil da expressão gênica e a função de genes envolvidos em tais fenômenos, permitiria elucidar o ambiente molecular das lesões endometrióticas. Futuramente, novos marcadores moleculares podem ser identificados, permitindo um diagnóstico menos invasivo e possíveis terapêuticas. Neste trabalho, investigamos o perfil de expressão gênica diferencial entre lesões endometrióticas (peritoniais e ovarianas) e endométrio eutópico das mesmas pacientes, na fase proliferativa inicial do ciclo menstrual.

OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho é analisar a expressão gênica diferencial em lesões endometrióticas peritoniais e ovarianas e em tecido eutópico das mesmas pacientes, pela técnica de RaSH.

Os objetivos intermediários foram:

- (1) analisar o perfil de expressão em lesões endometrióticas e em endométrio eutópico de pacientes com diagnóstico confirmado de endometriose;
- (2) identificar genes candidatos relacionados à fisiopatologia da doença;
- (3) comparar o padrão de expressão dos genes selecionados em lesões peritoniais e endometriomas ovarianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética Molecular Humana, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP, Brasil), em colaboração com o serviço de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, com o Grupo de Bioinformática da FMRP-USP, e com apoio dos laboratórios de Genética Molecular e Bioinformática da Fundação Hemocentro e de Oncologia Pediátrica do Departamento de Pediatria e Puericultura da FMRP-USP. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, processo HCRP nº 11736/2004 (Anexo A). Todas as pacientes participantes da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

CASUÍSTICA

Foram selecionadas 28 pacientes, que preencheram os seguintes critérios de inclusão: pacientes em idade reprodutiva (18 a 40 anos), no início da fase proliferativa do ciclo menstrual (dias 5-8), apresentando ciclos menstruais regulares e sem história de uso de qualquer tipo de terapia hormonal nos últimos seis meses antes da coleta. O estadió da endometriose foi determinado de acordo com a classificação da *American Society for Reproductive Medicine* (American Society for Reproductive Medicine, 1997).

As pacientes foram divididas em dois grupos: grupo controle, com onze pacientes sem diagnóstico de endometriose e/ou infertilidade, encaminhadas ao serviço pelo Ambulatório de Planejamento Familiar com indicação para laqueadura tubária; grupo afetado, com dezessete pacientes com diagnóstico de endometriose, sendo que, dez pacientes foram encaminhadas ao serviço para laparoscopia pelo Ambulatório de Dor Pélvica e Endoscopia (AGDE) com indicação de dor pélvica, e sete foram encaminhadas pelo Ambulatório de Infertilidade Conjugal do HCFMRP-USP com indicação de infertilidade.

AMOSTRAS

As biópsias de endométrio das pacientes do grupo controle (n=11) foram coletadas utilizando Cureta de Novak.

As biópsias de endométrio eutópico (n=17) e ectópico (n=17) das pacientes com diagnóstico de endometriose foram coletadas por laparoscopia. Das dezessete biópsias de endométrio ectópico, oito eram lesões peritoniais (4 vermelhas e 4 negras), sendo quatro em estadio II, duas em estadio III e duas em estadio IV, e nove corresponderam a lesões ovarianas (endometrioma ovariano) em estadios III (2) e IV (7). A confirmação diagnóstica foi feita após análise histopatológica de todas as amostras. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C após tratamento com criopreservador *Tissue-Tek[®] O.C.T. Compound* (Sakura Finetek USA. Inc., Torrance, CA).

ISOLAMENTO DO RNA TOTAL

As amostras foram lavadas em solução de PBS (1x) (NaCl 8,50g/L; Na_2HPO_4 1,11g/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,81g/L; KH_2PO_4 0,20g/L pH7,0) para retirar o criopreservador dos tecidos. Em seguida, extraiu-se RNA total (50mg de tecido) com TRIZOL[®] Reagent (*Invitrogen Life Technologies*, Paisley, UK) de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese. As concentrações de RNA total foram medidas em espectrofotômetro a densidade óptica de 260nm. O RNA permaneceu armazenado à -80°C para procedimentos posteriores.

RÁPIDA HIBRIDAÇÃO SUBTRATIVA DE cDNA (RASH)

Os procedimentos da técnica de RaSH adotados neste trabalho seguiram a metodologia descrita por Jiang e colaboradores (2000). Foram construídas duas bibliotecas de hibridação subtrativa de cDNA denominadas de RHENDN e RHENEN. Na biblioteca

RHENDN, o *tester* é o cDNA obtido do *pool* de RNA do tecido eutópico, enquanto que, na RHENEN, utilizou-se o RNA do tecido ectópico como *tester*. Seis amostras pareadas foram escolhidas aleatoriamente para a construção das bibliotecas, sendo, seis de endométrio ectópico (3 lesões ovarianas e 3 peritoniais) e seis de endométrio eutópico das mesmas pacientes. O protocolo está brevemente descrito abaixo:

Síntese do cDNA

A partir do *pool* de 25 µg de RNA total, utilizando mesma concentração de cada amostra, sintetizamos cDNAs de dupla fita utilizando 200U da enzima *SuperScriptTM II Reverse Transcriptase* (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK), 1x *First Strand Buffer* (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK), 200 µM de cada dNTP, e 0,5 µg de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK), para síntese da primeira fita. Para a síntese da segunda fita, foram utilizados 10U de *E. coli DNA ligase* (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) e 40U de *E. coli DNA Polymerase I* (Invitrogen), 2U de *E. coli RNase H* (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK), 200 µM de cada dNTP, 1x *Second Buffer* (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). O gene *ACTB* (*actin beta*) foi amplificado por PCR, a partir do cDNA sintetizado, para avaliar a qualidade da síntese. Os cDNAs foram extraídos por fenol/clorofórmio (1:1) e precipitado com etanol.

Digestão Enzimática com *MboI* e Ligação dos Adaptadores

Os cDNAs foram digeridos com 20U da enzima de restrição *MboI* (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) por 1 hora a 37⁰C, e em seguida extraíram-se os fragmentos pelo método fenol/clorofórmio (1:1), precipitados com etanol. Os fragmentos foram ligados com 20 µM dos adaptadores XDPN-14 - 5' CTGATCACTCGAGA - 3' e XDPN-12- 5'GATC TCTCGAGT3', usando 1x *T4 DNA Ligase Buffer* (Invitrogen Life Technologies, Paisley,

UK), 9U *T4 DNA Ligase* (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK), e a mistura incubada a 14°C *overnight*.

PCR e Purificação dos Produtos

Para checar a ligação aos adaptadores e amplificar o cDNA digerido, este foi diluído com LoTE (3mM Tris-HCL, pH 7,5; 0,2 mM EDTA pH 7,5) (*Invitrogen Life Technologies*, Paisley, UK), em um volume final de 100µL; e 2µL do cDNA foram amplificados com 10µM do *primer* XDPN-18 - 5'CTGATCACTCGAGAGATC3' (complementar aos adaptadores), 1U de *Taq DNA Polymerase* (*Invitrogen Life Technologies*, Paisley, UK), 200 µM de cada dNTP, 1x *Taq Buffer* (*Invitrogen Life Technologies*, Paisley, UK). Foram realizadas 20 reações de PCR nestas condições, e em seguida os produtos foram misturados e purificados por fenol/clorofórmio e precipitados com etanol.

Todos estes procedimentos foram realizados para o cDNA obtido do *pool* de RNA tanto do tecido eutópico como do tecido ectópico.

Digestão do teste

Foram digeridos 10 µg do *tester* (eutópico ou ectópico) com 20U da enzima *XhoI* (*Invitrogen Life Technologies*, Paisley, UK) por 6h à 37°C. O produto foi extraído com fenol/clorofórmio e precipitado com etanol.

Hibridação Subtrativa

Na construção da biblioteca RHENDN, 100 ng do *tester* (eutópico) foram misturados com 5 µg do *driver* (ectópico). Assim como na RHENEN, 100ng do *tester* (ectópico) foram misturados com 5µg do *driver* (eutópico). Foram adicionados à mistura *tester/driver*, 16,6 µl da Solução de Hibridação (0,5M de NaCl; 50mM de Tris/HCl; SDS 0,2%; formamida 40%).

Após denaturação a 100°C por 5 minutos, a solução foi incubada a 42°C por 48 h. Em seguida, a mistura da hibridação foi extraída por fenol/clorofórmio, precipitada com etanol e diluída em LoTE.

Ligação ao plasmídeo pZErO®-1 e Transformação Bacteriana

Três microlitros da solução de hibridação foram ligados à 1 µg do plasmídeo pZErO®-1 (*Invitrogen Life Technologies*, Paisley, UK), previamente digerido com a enzima de restrição *XhoI*, e a solução incubada a 16°C por 3 horas. Em seguida, realizamos a eletroporação a 2,5 V, 25 µFD e 200 OHMS para transformação das bactérias competentes *One Shot® Top 10 Eletrocomp™ E. coli* (*Invitrogen Life Technologies*, Paisley, UK) com 2 µL dos plasmídeos recombinantes.

Screening das Colônias e Análise por Seqüenciamento

As colônias foram randomicamente selecionadas e amplificadas por PCR com os primers M13 forward - 5'CATTTTGCTGCCGGTC3' e M13 reverse - 5'CAGGAAACAGCTATGACC3' para a confirmação do inserto. Após confirmação, o produto foi seqüenciado no *MegaBace™ 1000* (*Amesham Biosciences, Piscataway, NJ, USA*) utilizando *DYEnamic ET Dye Terminator Sequencing Kit* (*Amesham Biosciences, Piscataway, NJ, USA*), segundo as normas do fornecedor.

ANÁLISES POR BIOINFORMÁTICA

As seqüências obtidas foram analisadas pelos softwares *Phred* (Ewing *et al.*, 1998; Ewing e Green, 1998) e *Phrap* (Green, 1996) utilizando os seguintes padrões: *phred cutoff* de 0,09, *cross_match* versão 0,990319, *minmatch* 10, *minscore* 20; e foram aceitas seqüências com o mínimo de 100pb com qualidade. Após estas análises, as seqüências de melhor

qualidade foram submetidas ao programa de alinhamento *blast* (Altschul *et al.*, 1990). Estas comparações foram feitas contra os bancos de dados: do genoma mitocondrial humano (*blastn*, *evaluate*= $1e^{-05}$), genoma de bactérias (*blastn*, *evaluate*= $1e^{-30}$), seqüências do fungo *Saccharomyces* (*blastn*, *evaluate*= $1e^{-30}$), proteínas ribossomais (*blastx*, *evaluate*= $1e^{-30}$), *RefSeq* humano (*blastn*, *evaluate*= $1e^{-30}$), seqüências do *UniGene* (*blastn*, *evaluate*= $1e^{-25}$), *ESTs* humanas (*blastn*, *evaluate*= $1e^{-20}$), nr humano (*blastx*, *evaluate*= $1e^{-20}$), e nr não humano (*blastx*, *evaluate*= $1e^{-15}$).

A partir dos resultados do *blast*, apenas com o banco obtido de *RefSeq*, (seqüências de referência) foram selecionadas as seqüências que no alinhamento apresentavam no mínimo 90% do comprimento da seqüência alvo. Devido ao critério de seleção adotado, os genes selecionados do *blast* podem ser considerados homólogos às seqüências encontradas nas bibliotecas. Assim, estes genes foram categorizados quanto suas funções em processos biológicos, função molecular e componente celular de acordo com os termos do *Gene Ontology* (GO) (<http://www.geneontology.org>).

Além disso, para encontrar associações feitas entre dados na literatura sobre endometriose e os genes obtidos nas bibliotecas, usamos o programa de busca de acesso público *PDQ wizard v.0.1 Searching PubMed* (Grimes *et al.*, 2006) disponível *on line* (<http://www.gti.ed.ac.uk/pdqwizard>).

VALIDAÇÃO DOS DADOS DA RASH POR PCR EM TEMPO REAL

Para validar os dados de expressão gênica diferencial obtidos pela metodologia de hibridação subtrativa de cDNA, aplicamos a técnica de PCR em tempo real para seis genes. Para a seleção dos genes consideramos: quantas vezes suas seqüências foram obtidas, e sua função relacionada à etiologia da doença. Os genes selecionados foram: *SPARC* (*secreted protein, acidic, cysteine-rich* – 10 vezes) e *CTGF* (*connective tissue growth factor* – 7 vezes)

encontrados como superexpressos no endométrio ectópico; e os genes *PAEP* (*progestagen-associated endometrial protein* – 126 vezes), *IGFBP1* (*insulin-like growth factor binding protein 1* – 6 vezes), *MMP3* (*matrix metalloproteinase 3* – 23 vezes) e *MYC* (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog* – 2 vezes) encontrados como menos expressos no endométrio ectópico.

Um micrograma de RNA total de cada amostra foi transcrito reversamente usando o *High Capacity cDNA Archive Kit* (*Applied Biosystems, Warrington, UK*) segundo as instruções do fabricante. Das 45 amostras totais coletadas, 44 (10 de endométrio controle, 17 de tecidos eutópicos e 17 de tecidos ectópicos) foram analisadas para a quantificação relativa da expressão dos genes selecionados no aparelho *ABI PRISM™ 7500 Sequence Detection Systems* (*Applied Biosystems, Warrington, UK*). Uma das amostras de endométrio controle foi escolhida aleatoriamente como calibrador da reação. As reações foram executadas utilizando o sistema *TaqMan® Gene Expression Assays* (*TaqMan® MGB probes, FAM™ dye-labeled*) da *Applied Biosystems*. As sondas e os *primers* para os genes *PAEP* (Hs01046125_m1), *CTGF* (Hs00170014_m1), *IGFBP1* (Hs00236877_m1), *MMP3* (Hs00968308_m1), *SPARC* (Hs00277762_m1), *MYC* (Hs00153408_m1) e *GAPDH* (*glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase*) (Hs99999905_m1, controle endógeno) foram obtidos usando *Assay-on-Demand™ Gene Expression Products* (*Applied Biosystems, Warrington, UK*). Para testar a eficiência das sondas e *primers* na reação de amplificação dos genes foram construídas curvas de calibração a partir de diluições seriadas (não diluído, 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), em triplicata, do cDNA obtido por *pool* de quantidades iguais de todas as amostras. A curva-padrão foi construída a partir da curva de calibração. Foram consideradas as curvas-padrão com *slope* entre -3,6 e -3,1. As figuras 1 e 2 representam, respectivamente, a curva de calibração e curva-padrão construídas para o gene *MMP3*.

A PCR em tempo real foi realizada para cada amostra em duplicata seguindo as seguintes condições: 10 µL do *TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x)* (*Applied Biosystems, Warrington, UK*), 1 µL do *TaqMan® Gene Expression Assay Mix (20X)* (*Applied Biosystems, Warrington, UK*) e 9 µL de cDNA diluído (diluição de 1/50) em volume final de 20 µL reação. As condições da reação foram 50°C por 2 minutos, então 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

O nível de expressão para os genes analisados foi calculado para cada amostra de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (ou 2-Ct), descrito previamente no *Applied Biosystems User Bulletin # 2* (PN 4303859) (*Applied Biosystems, Warrington, UK*) e citado na literatura (Schmittgen *et al.*, 2000; Livak and Schmittgen, 2001). O *GAPDH* (controle endógeno) e o calibrador foram usados como normalizadores para os cálculos do $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Figura 1: Curva de calibração para o gene *MMP3*. Foi colocada a fluorescência da amplificação versus o número de ciclos da PCR.

Fonte: ABI PRISM™ 7500 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Warrington, UK).

Figura 2: Curva-padrão do gene *MMP3* indicando um *slope* de $-3,1$.

Fonte: ABI PRISM™ 7500 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Warrington, UK).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A variável expressão gênica foi transformada pelo $\log_{10}$. A transformação logarítmica foi necessária, pois não foi atendida uma das suposições (linearidade) feitas em análises empregando-se os modelos lineares. Estas análises especificam que a média condicional $E(y|x = x_0)$ da variável resposta y dado o valor x_0 do vetor preditor x , é linear em x_0 . A aplicação dos modelos lineares pode ser estendida supondo-se que uma transformação apropriada da variável resposta dada por $t(y)$, em que $E\{t(y)|x\}$, seja linear em x , na função $t(y) = \beta_0 + \beta^T x + \varepsilon$, para β_0 e β^T desconhecidos. O termo ε (erro aleatório) é independente de x e tem média zero (Cook and Weisberg, 1994).

As análises estatísticas foram realizadas no *software SAS 2003* (2002-2003, *SAS Institute Inc.*, Cary, NC, USA). Aplicamos o Teste T não pareado para comparar as médias de expressão dos genes obtidas entre: (1) endométrio controle de mulheres sem endometriose e endométrio eutópico de mulheres com endometriose, e (2) tecido ectópico peritonal e ectópico ovariano. Usou-se o Teste de T pareado para comparar as médias de expressão dos genes obtidas entre: (3) tecido eutópico e ectópico (lesões peritoniais + endometrioma ovariano), (4) tecido eutópico e ectópico de pacientes com lesões peritoniais, e (5) tecido eutópico e ectópico de pacientes com lesões ovarianas. Todos os testes foram realizados conforme os procedimentos GLM. Além disso, foram feitas análises de correlação pelo *PROC CORR* entre os níveis de expressão gênica obtidos nos tecidos ectópicos com o estadiamento das lesões. Análises com $P < 0,05$ foram consideradas significantes.

RESULTADOS

BIBLIOTECAS DE HIBRIDAÇÃO SUBTRATIVA DE CDNA (RASH)

Após a confecção das bibliotecas, 768 clones foram obtidos para a biblioteca RHENDN, dos quais 627 eram seqüências de qualidade, categorizadas como: mitocondrial (176), *EST* do fungo *Saccharomyces* (0), *UniGene* (4), outros não redundantes (1), ribossomal (16), *EST* Humano (8), bactérias (2) (dados sumarizados tabela I - Anexo B), e *RefSeq* (420). Já para a RHENEN, obteve-se 1056 clones, dos quais 712 tinham qualidade e foram classificadas como: mitocondrial (39), *EST* do fungo *Saccharomyces* (3), *UniGene* (21), outros não redundantes (1), ribossomal (136), *EST* Humano (18), bactérias (4) (dados sumarizados na tabela I - Anexo B), e *RefSeq* (490). As seqüências listadas como mitocondrial, *EST* do fungo *Saccharomyces*, bactérias, e outros não redundantes foram consideradas como contaminantes.

Das 910 *RefSeq*, 109 foram excluídas das análises como falso-positivas (tabela II - Anexo C), pois apareceram em ambas as bibliotecas. Assim, após a seleção das *RefSeq* que apresentaram no mínimo 90% de homologia com a seqüência alvo do alinhamento, permaneceram: 345 *RefSeq* para a biblioteca RHENDN e 380 para a RHENEN. Estas seqüências estão sumarizadas na tabela III (abaixo), que representa os genes superexpressos e os menos expressos no tecido ectópico comparado com o eutópico de mulheres com endometriose.

Tabela III: Estão representados abaixo os genes superexpressos e menos expressos no tecido ectópico em relação ao eutópico de mulheres com endometriose, localização cromossômica, alterações cromossômicas e referências relacionadas à endometriose.

GENES SUPEREXPRESSOS					
Nº Acesso	Descrição	Símbolo	Número de Sequências	Localização Cromossômica	Alterações Genômicas CGH (Gogusev <i>et al.</i> , 1999; Gogusev <i>et al.</i> , 2000)
NM_015381	family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like), member A5	<i>FAM19A5</i>	1	22q13.32	
NM_013349	neuron derived neurotrophic factor	<i>NENF</i>	1	1q32.3	Ganho 1q
NM_153005	RIO kinase 1 (yeast)	<i>RIOK1</i>	1	6p24.3	Ganho 6p
NM_002510	glycoprotein (transmembrane) nmb	<i>GPNMB</i>	1	7p15	
NM_005973	papillary renal cell carcinoma (translocation-associated)	<i>PRCC</i>	1	1q21.1	Ganho 1q
NM_000671	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide (ADH5)	<i>ADH5</i>	1	4q21-q25	
NM_004899	brain and reproductive organ-expressed (TNFRSF1A modulator)	<i>BRE</i>	2	2p23.2	
NM_019054	family with sequence similarity 35, member A	<i>FAM35A</i>	1	10q23.2	
NM_015393	DKFZP564O0823 protein	<i>DKFZP564O0823</i>	1	4q13.3-q21.3	

Continua

Continuação

NM_001008215	hypothetical protein MGC52110	MGC52110	1	2q11.2	
NM_006886	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit	ATP5E	1	20q13.32	
NM_001012506	coiled-coil domain containing 66	CCDC66	1	3p14.3	
NM_001011655	transmembrane protein 44	TMEM44	1	3q29	
NM_018255	elongation protein 2 homolog (S. cerevisiae)	ELP2	1	18q12.2	
NM_014188	SSU72 RNA polymerase II CTD phosphatase homolog (S. cerevisiae)	SSU72	1	1p36.33	
NM_001037163	hypothetical protein LOC84792	MGC12966	1	7p22.1	
NM_006493	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 5	CLN5	1	13q21.1-q32	Montagna <i>et al.</i> , 2007.
NM_005578	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	LPP	1	3q28	
NM_006572	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13	GNAI3	1	17q24.3	Ganho 17q
NM_005114	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1	HS3ST1	1	4p16	
NM_001039591	ubiquitin specific peptidase 9, X-linked	USP9X	1	Xp11.4	
NM_006196	poly(rC) binding protein 1	PCBP1	1	2p13-p12	
NM_170740	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1 (succinate-semialdehyde dehydrogenase)	ALDH5A1	1	6p22.2-p22.3	Ganho 6p
NM_012420	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	IFIT5	1	10q23.31	
NM_001032383	polyglutamine binding protein 1	PQBP1	1	Xp11.23	
NM_014924	KIAA0831	KIAA0831	1	14q22.3	
NM_002165	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	ID1	1	20q11	

Continuação

NM_022484	transmembrane protein 168	<i>TMEM168</i>	1	7q31.32	Ganho 7q
NM_015932	proteasome maturation protein	<i>POMP</i>	1	13q12.3	
NM_003014	secreted frizzled-related protein 4	<i>SFRP4</i>	1	7p14.1	
NM_020122	potassium channel modulatory factor 1	<i>KCMF1</i>	1	2p11.2	
NM_203330	CD59 molecule, complement regulatory protein activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	<i>CD59</i>	1	11p13	
NM_182810		<i>ATF4</i>	1	22q13.1	
NM_001386	dihydropyrimidinase-like 2	<i>DPYSL2</i>	1	8p22-p21	
NM_138786	transmembrane 4 L six family member 18	<i>TM4SF18</i>	1	3q25.1	
NM_021999	integral membrane protein 2B	<i>ITM2B</i>	1	13q14.3	
NM_012072	CD93 molecule	<i>CD93</i>	1	20p11.21	
NM_002795	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 3	<i>PSMB3</i>	1	17q12	Ganho 17q
NM_000712	biliverdin reductase A	<i>BLVRA</i>	1	7p14-cen	
NM_001007224	GTPase, IMAP family member 6	<i>GIMAP6</i>	1	7q36.1	Ganho 7q
NM_033429	calmodulin-like 4	<i>CALML4</i>	1	15q23	
NM_015972	polymerase (RNA) I polypeptide D, 16kDa	<i>POLR1D</i>	1	13q12.2	
NM_003375	voltage-dependent anion channel 2	<i>VDAC2</i>	1	10q22	
NM_015190	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 9	<i>DNAJC9</i>	1	10q22.2	
NM_002970	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	<i>SAT1</i>	1	Xp22.1	

						Continuação García-Manero <i>et al.</i> , 2007.
NM_001025368	vascular endothelial growth factor A kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 2	VEGFA	1	6p12	Ganho 6p	
NM_015483		KBTD2	1	7p14.3		
NM_017747	ankyrin repeat and KH domain containing 1	ANKHD1	1	5q31.3		
NM_014267	chromosome 11 open reading frame 58	C11orf58	1	11p15.1		
NM_007236	calcium binding protein P22	CHP	1	15q13.3		
NM_001031684	splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa	SFRS7	1	2p22.1		
NM_016085	chromosome 2 open reading frame 28	C2orf28	1	2p23.3		
NM_003302	thyroid hormone receptor interactor 6	TRIP6	1	7q22	Ganho 7q	
NM_020121	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 2 serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6	UGCG2	1	13q32.1		
NM_004568		SERPINB6	1	6p25	Ganho 6p	
NM_003994	KIT ligand	KITLG	1	12q22		Osuga <i>et al.</i> , 2000.
NM_003336	ubiquitin-conjugating enzyme E2A (RAD6 homolog)	UBE2A	1	Xq24-q25		
NM_000466	peroxisome biogenesis factor 1	PEX1	1	7q21.2	Ganho 7q	
NM_002078	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4	GOLGA4	1	3p22-p21.3		
NM_006694	jumping translocation breakpoint	JTB	1	1q21	Ganho 1q	
NM_002399	Meis homeobox	MEIS2	1	15q14		
NM_016282	adenylate kinase 3 Homo sapiens acetyl-Coenzyme A	AK3	1	9p24.1-p24.3		
NM_000019	acetyltransferase 1	ACAT1	1	11q22.3-q23.1		

Continuação

NM_005803	flotillin 1	<i>FLOT1</i>	1	6p21.3	Ganho 6p
NM_002484	nucleotide binding protein 1 (MinD homolog, E. coli)	<i>NUBP1</i>	1	16p13.13	
NM_004938	death-associated protein kinase 1	<i>DAPK1</i>	1	9q34.1	
NM_016299	heat shock 70kDa protein 14	<i>HSPA14</i>	1	10p13	
NM_001967	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	<i>EIF4A2</i>	1	3q28	
NM_001539	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	<i>DNAJA1</i>	1	9p13-p12	
NM_000107	damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa	<i>DDB2</i>	1	11p12-p11	
NM_000184	hemoglobin, gamma G	<i>HBG2</i>	1	11p15.5	
NM_198530	matrix-remodelling associated 7	<i>MXRA7</i>	1	17q25.1-q25.2	Ganho 17q
NM_001514	general transcription factor IIB	<i>GTF2B</i>	1	1p22-p21	
NM_003199	transcription factor 4	<i>TCF4</i>	1	18q21.1	
NM_005066	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	<i>SFPQ</i>	1	1p34.3	
NM_006636	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	<i>MTHFD2</i>	1	2p13.1	
NM_001001522	transgelin	<i>TAGLN</i>	1	11q23.2	Kyama <i>et al.</i> , 2006
NM_018222	parvin, alpha	<i>PARVA</i>	1	11p15.3	
NM_000378	Wilms tumor 1	<i>WT1</i>	1	11p13	Matsuzaki <i>et al.</i> , 2006.
NM_016107	zinc finger RNA binding protein	<i>ZFR</i>	1	5p13.3	

Continuação

NM_018025	G patch domain containing 1	GPATCH1	1	19q13.11	
NM_006169	nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	1	11q23.1	
NM_006324	craniofacial development protein 1	CFDP1	1	16q22.2-q22.3	
NM_020154	chromosome 15 open reading frame 24	C15orf24	1	15q14	
NM_019048	asparagine synthetase domain containing 1	ASNSD1	1	2p24.3-q21.3	
XM_943856	PREDICTED: hypothetical protein LOC648185, transcript variant 1	LOC648186	1		
NM_020532	reticulon 4	RTN4	1	2p16.3	
NM_001031700	chromosome 4 open reading frame 18	C4orf18	1	4q32.1	
NM_152280	synaptotagmin XI	SYT11	1	1q21.2	Ganho 1q
NM_001204	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	BMPR2	1	2q33-q34	
NM_032784	R-spondin 3 homolog (Xenopus laevis)	RSPO3	1	6q22.33	Ganho 6q
NM_001568	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa	EIF3S6	1	8q22-q23	
NM_014236	glyceronephosphate O-acyltransferase	GNPAT	1	1q42	Ganho 1q
NM_001293	chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A	CLNS1A	1	11q13.5-q14	
NM_004162	RAB5A, member RAS oncogene family polymerase (RNA) II (DNA directed)	RAB5A	1	3p24-p22	
NM_002696	polypeptide G	POLR2G	1	11q13.1	
NM_053025	myosin, light chain kinase	MYLK	1	3q21	
NM_022488	ATG3 autophagy related 3 homolog (S. cerevisiae)	ATG3	1	3q13.2	

Continuação

NM_002667	phospholamban	<i>PLN</i>	1	6q22.1	Ganho 6q
NM_002222	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	<i>ITPR1</i>	1	3p26-p25	
NM_004277	solute carrier family 25, member 27	<i>SLC25A27</i>	1	6p11.2-q12	Ganho 6p
NM_017599	vezatin, adherens junctions transmembrane protein	<i>VEZT</i>	1	12q22	
NM_001025079	CD47 molecule	<i>CD47</i>	1	3q13.1-q13.2	
NM_017680	asporin	<i>ASPN</i>	1	9q22	
NM_002072	guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide	<i>GNAQ</i>	1	9q21	
NM_003349	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	<i>Kua-UEV</i>	1	20q13.2	
NM_001037637	basic transcription factor 3	<i>BTF3</i>	1	5q13.2	
NM_005084	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	<i>PLA2G7</i>	1	6p21.2-p12	Ganho 6p
NM_182490	zinc finger protein 227	<i>ZNF227</i>	1	19q13.32	
NM_022059	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	<i>CXCL16</i>	1	17p13	
NM_002300	lactate dehydrogenase B	<i>LDHB</i>	1	12p12.2-p12.1	
NM_020313	cytokine induced apoptosis inhibitor 1	<i>CIAPIN1</i>	1	16q13-q21	
NM_016047	splicing factor 3B, 14 kDa subunit	<i>SF3B14</i>	1	2pter-p25.1	
NM_198178	microphthalmia-associated transcription factor	<i>MITF</i>	1	3p14.2-p14.1	
NM_199189	matrin 3	<i>MATR3</i>	1	5q31.2	
NM_001020658	pumilio homolog 1 (Drosophila)	<i>PUM1</i>	1	1p35.2	

Continuação

NM_153000	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	APCDD1	1	18p11.22	
NM_001015881	TSC22 domain family, member 3	TSC22D3	1	Xq22.3	
NM_006003	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	UQCRFS1	1	19q12-q13.1	
NM_001031713	chromosome 6 open reading frame 79	CCDC90A	1	6p24.3-p23	Ganho 6p
NM_001839	calponin 3, acidic ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E1	CNN3	1	1p22-p21	
NM_001039367		ATP6V1E1	1	22q11.1	
NM_001008897	t-complex 1	TCP1	2	6q25.3-q26	Ganho 6q
NM_015291	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 16	DNAJC16	2	1p36.1	
NM_006197	pericentriolar material 1	PCMI	2	8p22-p21.3	
NM_206839	mortality factor 4 like 1	MORF4L1	2	15q24	
XM_942776	PREDICTED: synaptopodin 2, transcript variant 3	SYNPO2	2		
NM_016091	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein	EIF3S6IP	2	22q	
NM_006628	cyclic AMP phosphoprotein, 19 kD	ARPP-19	2	15q21.2	
NM_138290	Rap2-binding protein 9	RPIB9	2	7q21.12	Ganho 7q
NM_198467	round spermatid basic protein 1-like	RSBNIL	2	7q11.23	Ganho 7q
NM_003850	succinate-CoA ligase, ADP-forming, beta subunit	SUCLA2	2	13q12.2-q13.3	
NM_001748	calpain 2, (m/II) large subunit	CAPN2	2	1q41-q42	Ganho 1q
NM_002264	karyopherin alpha 1 (importin alpha 5)	KPNA1	2	3q21	

Continuação

NM_002023	fibromodulin	<i>FMOD</i>	2	1q32	Ganho 1q
NM_018374	transmembrane protein 106B	<i>TMEM106B</i>	2	7p21.3	
NM_013236	ataxin 10	<i>ATXN10</i>	2	22q13.31	
NR_001564	X (inactive)-specific transcript	<i>XIST</i>	2	Xq13.2	
NM_004990	methionine-tRNA synthetase	<i>MARS</i>	2	12q13.2	
NM_000454	superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult) (SOD1)	<i>SOD1</i>	2	21q22.11	
NM_001001395	LIM domain only 3 (rhombotin-like 2)	<i>LMO3</i>	2	12p12.3	
NM_001039618	CREB/ATF bZIP transcription factor	<i>CREBZF</i>	2	11q14	
NM_007168	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8	<i>ABCA8</i>	2	17q24	Ganho 17q
NM_000177	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	<i>GSN</i>	2	9q33	
NM_002738	protein kinase C, beta 1	<i>PRKCB1</i>	2	16p11.2	
NM_013448	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A	<i>BAZ1A</i>	2	14q12-q13	
NM_173473	chromosome 10 open reading frame 104	<i>C10orf104</i>	2	10q22.1	
NM_213674	tropomyosin 2 (beta)	<i>TPM2</i>	2	9p13.2-p13.1	
NM_013254	TANK-binding kinase 1	<i>TBK1</i>	2	12q14.1	
NM_005506	scavenger receptor class B, member 2	<i>SCARB2</i>	2	4q21.1	
NM_001031679	methionine sulfoxide reductase B3	<i>MSRB3</i>	2	12q14.3	
NM_199511	coiled-coil domain containing 80	<i>CCDC80</i>	2	3q13.2	

Continuação

NM_013234	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 12	EIF3S12	2	19q13.2	
NM_020338	zinc finger, MIZ-type containing 1	ZMIZ1	2	10q22.3	
NM_138957	mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	2	22q11.21	
XM_371853	PREDICTED: similar to 60S ribosomal protein L27a	LOC389435	2		
NM_001615	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	ACTG2	2	2p13.1	
NM_001001894	tetratricopeptide repeat domain 3	TTC3	3	21q22.2	
NM_005724	tetraspanin 3	TSPAN3	3	15q24.3	
NM_206876	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	PPP1CB	3	2p23	
NM_015375	receptor interacting protein kinase 5	RIPK5	3	1q32.1	Ganho 1q
NM_000943	peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C)	PPIC	3	5q23.2	
NM_000700	annexin A1	ANXA1	3	9q12-q21.2	
NM_002802	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 1	PSMC1	3	14q32.11	
NM_014585	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	SLC40A1	3	2q32	
NM_000426	laminin, alpha 2 (merosin, congenital muscular dystrophy)	LAMA2	3	6q22-q23	Ganho 6q
NM_006513	seryl-tRNA synthetase	SARS	3	1p13.3-p13.1	
NM_014367	chromosome 3 open reading frame 28	C3orf28	3	3q21.1	
NM_003756	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 gamma, 40kDa	EIF3S3	3	8q24.11	
NM_004684	SPARC-like 1 (mast9, hevin)	SPARCL1	4	4q22.1	

						Continuação Matsuzaki <i>et al.</i> , 2001.
NM_004064	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	<i>CDKN1B</i>	4	12p13.1-p12		
NM_012134	leiomodlin 1 (smooth muscle)	<i>LMOD1</i>	4	1q32	Ganho 1q	
NM_002345	lumican	<i>LUM</i>	4	12q21.3-q22		
NM_001780	CD63 molecule	<i>CD63</i>	4	12q12-q13		
NM_022138	SPARC related modular calcium binding 2	<i>SMOC2</i>	4	6q27	Ganho 6q	
NM_201442	complement component 1, s subcomponent	<i>C1S</i>	4	12p13		
NM_001743	calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta)	<i>CALM2</i>	4	2p21		
NM_006360	PCI domain containing 1 (herpesvirus entry mediator)	<i>PCID1</i>	4	11p13		
NM_003295	tumor protein, translationally-controlled 1	<i>TPT1</i>	4	13q12-q14		
NM_002166	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	<i>ID2</i>	5	2p25		
NM_004048	beta-2-microglobulin	<i>B2M</i>	5	15q21-q22.2		Somigliana <i>et al.</i> , 2001.
NM_201348	proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein	<i>PRELP</i>	5	1q32	Ganho 1q	
NM_001018020	tropomyosin 1 (alpha)	<i>TPM1</i>	5	15q22.1		
NM_004537	nucleosome assembly protein 1-like 1	<i>NAP1L1</i>	5	12q21.2		
NM_003333	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	<i>UBA52</i>	6	19p13.1-p12		
NM_014624	S100 calcium binding protein A6	<i>S100A6</i>	7	1q21	Ganho 1q	
NM_001901	connective tissue growth factor	<i>CTGF</i>	7	6q23.1	Ganho 6q	Flores <i>et al.</i> , 2007.
NM_006098	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	<i>GNB2L1</i>	9	5q35.3		

Continuação

NM_003118	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPARC	10	5q31.3-q32	
NM_033138	caldesmon 1	CALD1	17	7q33	Ganho 7q
NM_001613	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	ACTA2	29	10q23.3	
380					

GENES MENOS EXPRESSOS

Nº Acesso	Descrição	Simbolos	Número de Sequências	Localização Cromossômica	Alterações Genômicas CGH (Gogusev <i>et al.</i> , 1999; Gogusev <i>et al.</i> , 2000)	Referencias Genes x Endometriose
NM_032940	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide C, 33kDa	POLR2C	1	16q13-q21		
NM_181472	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7	CMTM7	1	3p22.3		
NM_002568	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	PABPC1	1	8q22.2-q23		
NM_014300	SEC11-like 1 (S. cerevisiae)	SEC11A	1	15q25.3		
NM_018509	leucine rich repeat containing 59	LRRC59	1	17q21.33		
NM_015330	SPECC1-like	SPECC1L	1	22q11.23	Perda 22q	
NM_080821	chromosome 20 open reading frame 108	C20orf108	1	20q13.2		
NM_001014795	integrin-linked kinase	ILK	1	11p15.5-p15.4		
NM_005907	mannosidase, alpha, class 1A, member 1	MAN1A1	1	6q22		
XM_934318	PREDICTED: similar to eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8	LOC653352	1			

Continuação

NM_012426	splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa	<i>SF3B3</i>	1	16q22.1	
NM_001002292	G protein-coupled receptor 177	<i>GPR177</i>	1	1p31.3	Perda 1p
NM_144570	chromosome 16 open reading frame 34	<i>HN1L</i>	1	16p13.3	
NM_006601	prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)	<i>PTGES3</i>	1	12q13.3	
NM_004047	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 21kDa, V0 subunit b	<i>ATP6V0B</i>	1	1p32.3	Perda 1p
NM_000715	complement component 4 binding protein, alpha	<i>C4BPA</i>	1	1q32	
NM_006022	TSC22 domain family, member 1	<i>TSC22D1</i>	1	13q14	
NM_207307	chromosome 3 open reading frame 25	<i>C3orf25</i>	1	3q21.3	
NM_002423	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	<i>MMP7</i>	1	11q21-q22	
NM_003754	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon, 47kDa	<i>EIF3S5</i>	1	11p15.4	
NM_001797	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	<i>CDH11</i>	1	16q22.1	
NM_014064	chromosome 9 open reading frame 32	<i>C9orf32</i>	1	9q34.11	Perda 9q
NM_014306	chromosome 22 open reading frame 28	<i>C22orf28</i>	1	22q12	Perda 22q
NM_001005335	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	<i>HNRP L</i>	1	19q13.2	
NM_175932	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13	<i>PSMD13</i>	1	11p15.5	
NM_001428	enolase 1, (alpha)	<i>ENO1</i>	1	1p36.3-p36.2	Perda 1p
NM_030767	AT-hook transcription factor	<i>AKNA</i>	1	9q32	Perda 9q
NM_145729	mitochondrial ribosomal protein L24	<i>MRPL24</i>	1	1q21-q22	
NM_003720	Down syndrome critical region gene 2	<i>DSCR2</i>	1	21q22.3	

Bruner-Tran *et al.*, 2006.

Continuação

NM_022075	LAG1 homolog, ceramide synthase 2 (S. cerevisiae)	<i>LASS2</i>	1	1q21.2	
NM_002950	ribophorin I	<i>RPN1</i>	1	3q21.3	
NM_000088	collagen, type I, alpha 1	<i>COL1A1</i>	1	17q21.33	
NM_003564	transgelin 2	<i>TAGLN2</i>	1	1q21-q25	
NM_001012663	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	<i>SLC3A2</i>	1	11q13	
NM_003580	neutral sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor	<i>NSMAF</i>	1	8q12-q13	
NM_022762	required for meiotic nuclear division 5 homolog B (S. cerevisiae)	<i>RMND5B</i>	1	5q35.3	
NM_019894	transmembrane protease, serine 4	<i>TMPRSS4</i>	1	11q23.3	
NM_001001998	exosome component 10	<i>EXOSC10</i>	1	1p36.22	Perda 1p
NM_000942	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	<i>PPIB</i>	1	15q21-q22	
NM_198334	glucosidase, alpha; neutral AB	<i>GANAB</i>	1	11q12.3	
NM_001017402	laminin, beta 3	<i>LAMB3</i>	1	1q32	
NM_021729	vacuolar protein sorting 11 homolog (S. cerevisiae)	<i>VPS11</i>	1	11q23	
NM_015070	zinc finger CCCH-type containing 13	<i>ZC3H13</i>	1	13q14.12	
NM_031457	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8B	<i>MS4A8B</i>	1	11q12.2	
NM_002117	major histocompatibility complex, class I, C	<i>HLA-C</i>	1	6p21.3	
NM_000597	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	<i>IGFBP2</i>	1	2q33-q34	
NM_005204	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	<i>MAP3K8</i>	1	10p11.23	
NM_004078	cysteine and glycine-rich protein 1	<i>CSRP1</i>	1	1q32	

Kusume *et al.*,
2005.
Tang *et al.*,
1994.

Continuação

NM_004394	death-associated protein	<i>DAP</i>	1	5p15.2	
NM_173728	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 15	<i>ARHGEF15</i>	1	17p13.1	
NM_001669	arylsulfatase D	<i>ARSD</i>	2	Xp22.3	
NM_005168	Rho family GTPase 3	<i>RND3</i>	2	2q23.3	
NM_000362	TIMP metalloproteinase inhibitor 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudo-inflammatory)	<i>TIMP3</i>	2	22q12.3	Perda 22q
NM_006816	lectin, mannose-binding 2	<i>LMAN2</i>	2	5q35.3	
NM_016057	coatamer protein complex, subunit zeta 1	<i>COPZ1</i>	2	12q13.2-q13.3	
NM_001733	complement component 1, r subcomponent	<i>C1R</i>	2	12p13	
NM_152927	copine I	<i>CPNE1</i>	2	20q11.22	
NM_003321	Tu translation elongation factor, mitochondrial KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic	<i>TUFM</i>	2	16p11.2	
NM_006801	reticulum protein retention receptor 1	<i>KDELRL1</i>	2	19q13.3	
NM_004356	CD81 molecule	<i>CD81</i>	2	11p15.5	
NM_000358	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	<i>TGFBI</i>	2	5q31	Arimoto <i>et al.</i> , 2003.
NM_003355	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	<i>UCP2</i>	2	11q13	
NM_002467		<i>MYC</i>	2	8q24.21	Johnson <i>et al.</i> , 2005.
NM_006701	thioredoxin-like 4A	<i>TXNL4A</i>	2	18q23	
NM_052886	mal, T-cell differentiation protein 2	<i>MAL2</i>	2	8q23	
NM_014764	DAZ associated protein 2	<i>DAZAP2</i>	2	12q12	

Continuação

NM_015343	dullard homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	<i>DULLARD</i>	2	17p13	
XM_932704	PREDICTED: similar to 60S ribosomal protein L29 (Cell surface heparin binding protein HIP)	<i>LOC643433</i>	1		
NM_016395	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1	<i>PTPLAD1</i>	2	15q22.2	
NM_001540	heat shock 27kDa protein 1	<i>HSPB1</i>	2	7q11.23	
NM_004285	hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase)	<i>H6PD</i>	1	1p36	Perda 1p
NM_001034850	family with sequence similarity 134, member B	<i>FAM134B</i>	1	5p15.1	
NM_005347	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	<i>HSPA5</i>	2	9q33-q34.1	Perda 9q
NM_014372	ring finger protein 11	<i>RNF11</i>	2	1pter-p22.1	Perda 1p
NM_177967	UBA domain containing 2	<i>UBAC2</i>	2	13q32.3	
NM_015331	nicastrin	<i>NCSTN</i>	2	1q22-q23	
NM_001349	aspartyl-tRNA synthetase	<i>DARS</i>	2	2q21.3	
NM_001001481	ubiquitin-conjugating enzyme E2W (putative)	<i>UBE2W</i>	2	8q21.11	
NM_002425	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	<i>MMP10</i>	2	11q22.3	
NM_001469	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6 (Ku autoantigen, 70kDa)	<i>XRCC6</i>	2	22q13.2-q13.31	Perda 22q
NM_007355	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	<i>HSP90AB1</i>	3	6p12	
NM_057164	collagen, type VI, alpha 3	<i>COL6A3</i>	3	2q37	
NM_005040	prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C)	<i>PRCP</i>	3	11q14	
NM_003128	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	<i>SPTBN1</i>	3	2p21	

Continuação

NM_005727	tetraspanin 1	<i>TSPAN1</i>	3	1p34.1	Perda 1p	
NM_002797	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 5	<i>PSMB5</i>	3	14q11.2		
NM_006732	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	<i>FOSB</i>	2	19q13.32		
NM_020130	chromosome 8 open reading frame 4	<i>C8orf4</i>	3	8p11.2		
NM_001940	atrophin 1	<i>ATN1</i>	3	12p13.31		
NM_014713	lysosomal-associated protein transmembrane 4 alpha	<i>LAPTM4A</i>	3	2p24.1		
NM_001101	Homo sapiens actin, beta	<i>ACTB</i>	4	7p15-p12		
NM_002087	granulin	<i>GRN</i>	3	17q21.32		
NM_014679	centrosomal protein 57kDa	<i>CEP57</i>	1	11q21		
NM_175744	ras homolog gene family, member C	<i>RHOC</i>	4	1p13.1	Perda 1p	
NM_005566	lactate dehydrogenase A	<i>LDHA</i>	4	11p15.4		
NM_001002235	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	<i>SERPINA1</i>	6	14q32.1		
NM_000596	insulin-like growth factor binding protein 1	<i>IGFBP1</i>	6	7p13-p12		Klemmt <i>et al.</i> , 2006
NM_001961	eukaryotic translation elongation factor 2	<i>EEF2</i>	7	19pter-q12		
NM_002422	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	<i>MMP3</i>	23	11q22.3		Uzan <i>et al.</i> , 2004
NM_000518	hemoglobin, beta	<i>HBB</i>	25	11p15.5		
NM_001018049	progesterone-associated endometrial protein	<i>PAEP</i>	126	9q34	Perda 9q	Cornillie <i>et al.</i> , 1991.
						345

Portanto, foram identificados 191 genes superexpressos e 100 genes menos expressos. Além disso, estão destacadas nesta tabela, as referências na literatura que previamente associaram os genes encontrados com a doença, bem como, suas localizações cromossômicas e em quais destas regiões, já foram encontradas, por CGH, alterações genômicas em lesões endometrióticas.

A tabela IV (anexo D) apresenta a categorização dos genes encontrados nas bibliotecas quanto suas participações em processos biológicos. Esses genes foram relacionados a 283 processos biológicos diferentes.

VALIDAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL

Para a validação da RaSH foram selecionados dois genes (*CTGF* e *SPARC*) indicados como superexpressos e quatro genes (*MYC*, *MMP3*, *IGFBP1* e *PAEP*) como menos expressos no endométrio ectópico. Todas as análises de PCR aplicadas aos seis genes validaram os dados encontrados pela metodologia RaSH nas bibliotecas. Estes resultados, indicados nas figuras por (3), podem ser observados nas figuras 3, 4 e 5.

Também estão representados nestas figuras os demais dados de quantificação relativa, segundo o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (ou 2-Ct), observados para as expressões gênicas analisadas nos diferentes tecidos estudados, assim como, estão indicados por * quais destas diferenças foram significativas. Não detectamos correlação significativa entre os níveis de expressão obtidos no endométrio ectópico e o estadiamento da doença.

Figura 3: Dados da PCR em tempo real para os genes *CTGF* e *SPARC* apontados como superexpressos pela RaSH no endométrio ectópico. NE= endométrio controle (n=10), EU = endométrio eutópico (n=17), EC= endométrio ectópico (n=17, peritonal + ovariana), EC_P = ectópico peritonal (n=8), EC_O = ectópico ovariano (n=9), EU_P = eutópico de pacientes com lesão peritonal (n=8) e EU_O = eutópico de pacientes com lesão ovariana. Os números em parênteses foram usados para indicar as comparações entre: (1) NE x EU, (2) EC_P x EC_O, (3) EU x EC, (4) EU_P x EC_P e (5) EU_O x EC_O. As comparações marcadas por * apresentaram diferença significativa com $P \leq 0,05$.

Figura 4: Dados da PCR em tempo real para os genes *MYC* e *MMP3* apontados como menos expressos pela RaSH no endométrio ectópico. NE= endométrio controle (n=10), EU = endométrio eutópico (n=17), EC= endométrio ectópico (n=17, peritonal + ovariana), EC_P = ectópico peritonal (n=8), EC_O = ectópico ovariano (n=9), EU_P = eutópico de pacientes com lesão peritonal (n=8) e EU_O = eutópico de pacientes com lesão ovariana. Os números em parênteses foram usados para indicar as comparações entre: (1) NE x EU, (2) EC_P x EC_O, (3) EU x EC, (4) EU_P x EC_P e (5) EU_O x EC_O. As comparações marcadas por * apresentaram diferença significativa com $P \leq 0,05$.

Figura 5: Dados do RT-PCR em tempo real para os genes *IGFBP1* e *PAEP* apontados como menos expressos pela RaSH no endométrio ectópico. NE= endométrio controle (n=10), EU = endométrio eutópico (n=17), EC= endométrio ectópico (n=17, peritonal + ovariana), EC_P = ectópico peritonal (n=8), EC_O = ectópico ovariano (n=9), EU_P = eutópico de pacientes com lesão peritonal (n=8) e EU_O = eutópico de pacientes com lesão ovariana. Os números em parênteses foram usados para indicar as comparações entre: (1) NE x EU, (2) EC_P x EC_O, (3) EU x EC, (4) EU_P x EC_P e (5) EU_O x EC_O. As comparações marcadas por * apresentaram diferença significativa com $P \leq 0,05$.

DISCUSSÃO

Buscando elucidar o perfil de expressão gênica nas lesões endometrióticas e identificar genes que estejam envolvidos com esta doença complexa, vários trabalhos envolvendo a técnica de microarranjos foram realizados (Giudice *et al.*, 2001; Eyster *et al.*, 2002; Lebovic *et al.*, 2002; Arimoto *et al.*, 2003; Kao *et al.*, 2003; Absenger *et al.*, 2004; Matsuzaki *et al.*, 2004; Matsuzaki *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2007). A aplicação desta técnica no estudo da endometriose é problemática, pois são usados *chips* comerciais fabricados para outras finalidades que não estudos direcionados à doença (Bischoff e Simpson, 2004), somando-se o fato dos genes analisados serem pré-determinados, não permitindo o *screening* completo e característico das lesões.

Assim, as bibliotecas de hibridação subtrativas são técnicas de *screening* que contornam este problema. A biblioteca de hibridação subtrativa rápida (RaSH) isola genes diferencialmente expressos, incluindo novos genes e transcritos raros. Além disso, apresenta vantagens em relação às demais técnicas de hibridação subtrativa, pois simplifica os passos de hibridação e subtração. Além de ser eficiente na subtração diminuindo os falso-positivos, pode ser realizada de forma menos onerosa (Jiang *et al.*, 2000). Hu e colaboradores (2006) aplicaram a técnica de hibridação subtrativa de fase sólida usando *beads* magnéticos em endométrios eutópico e ectópico de mulheres com endometriose peritoneal, nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual. No presente trabalho, foram analisados também endométrios eutópico e ectópico de mulheres com endometriose, entretanto, selecionamos pacientes na fase proliferativa inicial do ciclo menstrual, incluindo lesões peritoniais e ovarianas. Já que o perfil de expressão gênica é variável com as fases do ciclo menstrual, a escolha de uma fase específica do ciclo, bem como a seleção de amostras pareadas é fundamental para homogeneização das variações cíclicas e individuais.

A metodologia RaSH foi eficiente em detectar transcritos diferencialmente expressos, pois obtivemos 1339 seqüências de qualidade, que após rigorosas seleções e classificações

resultaram em 291 genes indicados como desregulados, sendo 191 superexpressos e 100 menos expressos nas lesões (Tabela III). Embora a técnica tenha sido eficiente em detectar diferenças na expressão gênica, ela possui certa limitação. Nem todas as seqüências de cDNA comuns podem ser completamente removidas após a subtração (Hu *et al.*, 2006). Uma maneira de detectar esses falso-positivos é realizar duas bibliotecas: inicialmente o *tester* é avaliado como *tester*, a seguir ele passa a ser usado como *driver*. Seguindo este princípio, construímos duas bibliotecas: RHENEN (*tester*=ectópico X *driver*=eutópico) e RHENDN (*tester*=eutópico x *driver*=ectópico), que indicaram 13% de seqüências falso-positivas entre as *Refseq*.

Procurando comparar os genes encontrados no presente trabalho com dados descritos na literatura, encontramos 17 genes que já foram associados à endometriose, como por exemplo *MYC*, *MMP3*, *IGFBP1*, *CTGF* e *PAEP*, e 274 genes que ainda não foram estudados na doença, e que portanto são alvos para análises futuras, entre eles o *SPARC*. Além disso, comparando as localizações cromossômicas dos genes obtidos com as regiões que apresentam alterações genômicas detectadas previamente em lesões endometrióticas por CGH, 36 genes superexpressos e 16 genes menos expressos estavam em regiões de ganho e perda de material genômico, respectivamente (Tabela III). Entre estes genes, encontram-se o *PAEP* em região de perda 9q e *CTGF* em região de ganho 6q. Já foi demonstrado que alterações genômicas em pacientes com endometriose podem estar associadas ao desenvolvimento da doença (Gogusev *et al.*, 1999; Gogusev *et al.*, 2000), o que poderia justificar alguns dados de expressão diferencial encontrados.

Alguns eventos são necessários para o estabelecimento da endometriose, tanto para a implantação como para manutenção do tecido ectópico. Tais eventos são: fluxo menstrual retrógrado seguido de escape do sistema imune pelas células endometrióticas, adesão, invasão, proliferação celular, inibição de apoptose, angiogênese, produção local de estrógenos

e resposta à lesão (Nap *et al.*, 2004). A desregulação de genes que estejam envolvidos com estes processos pode levar ao estabelecimento e sobrevivência dos implantes endometrióticos. Portanto, após o agrupamento dos genes diferencialmente expressos quanto a sua participação em processos biológicos (Anexo D), relacionamos 283 processos diferentes, dos quais os mais relevantes para a doença foram: angiogênese (2 genes), adesão celular (18), motilidade celular (14), proliferação celular (18), resposta de defesa (7), processos do sistema imune (13), proteólise (17), regulação do crescimento celular (4), resposta à lesão (9), remodelamento tecidual (3), comunicação celular (49), diferenciação celular (24) e morte celular programada (15).

Para a validação das bibliotecas subtrativas foram selecionados os genes *CTGF* e *SPARC* encontrados como superexpressos e os genes *PAEP*, *IGFBP1*, *MMP3* e *MYC* encontrados como menos expressos no endométrio ectópico. Além de analisar os dados nas 12 amostras utilizadas para a construção das bibliotecas, ampliamos o número amostral para 44 (10 endométrios controles de mulheres sem endometriose, 17 tecidos eutópicos e 17 tecidos ectópicos de mulheres com endometriose, sendo 8 peritoniais e 9 ovarianas) com o intuito de estabelecer possível envolvimento dos genes com a doença.

Todos os genes validaram as diferenças de expressão detectadas pelas bibliotecas. Entretanto, estas diferenças foram significativas entre os grupos de endométrio eutópico e ectópico (todas as lesões) apenas para os genes *SPARC*, *MMP3* e *PAEP*. Quando as análises foram feitas separando-se o grupo de lesões peritoniais dos endometriomas ovarianos e comparando-os com seus tecidos autólogos, diferenças significativas nas lesões peritoniais foram obtidas para os genes *SPARC*, *MYC*, *IGFBP1*, *PAEP* e nos endometriomas ovarianos para os genes *MMP3* e *PAEP*. Além disso, os genes *SPARC* e *IGFBP1* mostraram diferenças significativas de expressão, quando comparamos as lesões peritoniais com as ovarianas. Provavelmente, o agrupamento das lesões tenha mascarado diferenças de expressão que são

características específicas dos locais onde as lesões se formam. Assim, as diferenças observadas entre o endométrio eutópico e as lesões endometrióticas de pacientes afetadas podem ser explicadas como consequência direta dos diferentes ambientes endócrinos, como o fluido peritonial e o microambiente intra-ovariano das lesões, em relação ao ambiente intra-uterino (Koninckx *et al.*, 1998).

O *SPARC* é uma proteína matricelular anti-adesiva que media as interações entre a matriz extracelular e as células (Bradshaw e Sage, 2001). Tal gene está envolvido em vários processos biológicos incluindo remodelamento tecidual, adesão celular, angiogênese, proliferação, migração e invasão tumoral (Bradshaw e Sage, 2001; Kato *et al.*, 2001, Framson e Sage, 2004). A superexpressão do *SPARC* já foi associada a diminuição de E-caderina em melanoma aumentando o potencial invasivo do tumor (Smit *et al.*, 2007), ao aumento de motilidade celular em câncer de mama devido suas propriedades anti-adesivas (Briggs *et al.*, 2002; Campo Mcknight *et al.*, 2006) e estimulação do *VEGF* em células endoteliais levando ao aumento de angiogênese (Kato *et al.*, 2001). Além disso, foi demonstrado que o *SPARC* tem efeito de regulação positiva sobre *CTGF*, e este por sua vez responde ao *SPARC* por *feedback* negativo (Zhou *et al.*, 2006). O *CTGF* é um membro da família das CCN (*Cyr61*, *CTGF*, *NOV*), que parece estar envolvido em diversas funções celulares como a proliferação, adesão, migração, apoptose, produção da matriz extracelular, desenvolvimento embrionário, diferenciação tecidual, angiogênese, cicatrização, além de estar associado com várias patologias como fibrose, inflamação e crescimento tumoral (Lau e Lam, 1999; Moussad e Brigstock, 2000; Rageh *et al.*, 2001). Absenger e colaboradores (2004) detectaram um aumento de expressão do *CTGF* no endométrio eutópico de pacientes com endometriose em relação ao endométrio controle, por técnica de *microarrays*. Posteriormente, também foi detectada uma superexpressão deste gene em lesões endometrióticas induzidas em modelo animal (Flores *et al.*, 2007). Embora diferenças significativas entre os endométrios eutópico e

ectópico tenham sido detectadas apenas para o *SPARC*, é provável que a expressão alterada destes dois genes permita o estabelecimento e manutenção dos implantes endometrióticos, por regularem mecanismos de invasão e angiogênese.

O desarranjo da matriz extracelular é um evento normal e essencial para o desenvolvimento embrionário, morfogênese, reprodução, reabsorção e remodelamento tecidual. As MMPs e seus inibidores (TIMPs) têm participação essencial neste evento (Nagase e Woessner, 1999). Embora a expressão endometrial das MMPs e TIMPs seja regulada ciclicamente (Goffin *et al.*, 2003), perfis alterados de expressão têm sido detectados em tecidos de endométrio ectópico e eutópico de pacientes com endometriose, o que pode ser resultado da falta de resposta à progesterona encontrada em mulheres com esta doença. Tal deficiência de resposta pode estar associada com a falha na supressão das MMPs e consequentemente invasão do tecido endometrial em locais extra-uterinos (Bruner-Tran *et al.*, 2002). Gilabert-Estellés e colaboradores (2003) encontraram uma maior expressão da MMP-3 em tecido endometrial eutópico de mulheres com endometriose que no endométrio controle. Além disso, detectaram uma menor atividade proteolítica em endometrioma ovariano, como resultado da superexpressão do TIMP-I. Contudo, Uzan e colaboradores (2004) detectaram uma maior expressão da MMP-3 no endométrio normal de mulheres sem endometriose em relação ao eutópico de pacientes com endometriose. Além disso, mostraram uma maior expressão desta metaloproteinase em endometriose colo-retal, quando comparada a lesões peritoniais e endometrioma ovariano. Neste trabalho, encontramos uma menor expressão do gene *MMP3* em lesões endometrióticas, o que pode indicar uma menor atividade invasiva das lesões por já estarem localmente estabelecidas.

A superexpressão do *MYC* pode levar tanto à proliferação celular como à apoptose (Thompson, 1998). A indução da morte celular programada por este gene está relacionada com a liberação do citocromo c (Juin *et al.*, 1999). A superexpressão do gene anti-apoptótico

BCL-2 (*B-cell lymphoma/leukaemia-2*) protege as células da ação do *MYC* por bloquear a liberação do citocromo c (Wagner *et al.*, 1993; Yang e Korsmeyer, 1996), mas não tem efeito na sua ação proliferativa (Hoffman e Liebermann, 1998). Já o *BAX* (*BCL2-associated X protein*), membro pró-apoptótico da família bcl-2, estimula a morte celular por liberar o citocromo c e consequentemente induzir o *MYC* (Mitchell *et al.*, 2000). No endométrio eutópico de mulheres com endometriose, já foram descritas tanto a diminuição de células apoptóticas (Braun *et al.*, 2002) como a superexpressão do *BCL-2* e a repressão do *BAX* (Meresman *et al.*, 2000). Apesar disso, Johnson e colaboradores (2005) encontraram uma maior expressão do *MYC* no endométrio eutópico de mulheres com endometriose, em relação ao endométrio de mulheres normais. Embora os dados sobre a regulação e funções associadas à expressão do *MYC* sejam controversos na literatura, é possível que a baixa expressão deste gene em lesão endometriótica seja resultado da perda de estimulação de apoptose pela via de regulação *MYC*, *BCL-2* e *BAX* alterada nas lesões endometrióticas.

O IGF-I (*insulin-like growth factor-I*) e o IGF-II estão presentes no endométrio humano, e são potentes indutores de proliferação e crescimento em cultura de células endometriais (Giudice *et al.*, 2003; Irwin *et al.*, 1993). Estes fatores são regulados pela família de *insulin-like growth factor binding proteins* (IGFBPs), sendo que o *IGFBP-1* atua como inibidor do IGF-I (Adashi, 1995). Algumas funções como supressão tumoral, indução de apoptose e diminuição da proliferação celular foram associadas ao aumento de expressão do *IGFBP-1* em câncer de próstata e de mama (Ngo *et al.*, 2003; Subramanian *et al.*, 2007). Foi detectada uma menor expressão deste gene em fluido folicular de pacientes com endometriose moderada e severa (Cunha-Filho *et al.*, 2003), um aumento de expressão no endométrio eutópico de babuínos com endometriose em relação ao endométrio normal (Kim *et al.*, 2007) e uma expressão reduzida em lesões endometrióticas quando comparada com tecido eutópico de pacientes com endometriose (Klemmt *et al.*, 2006). Além disso, aumento de IGF-I e IGF-II

foi detectado no fluido peritoneal de pacientes com endometriose (Giudice *et al.*, 1994). Esses dados da literatura apóiam os resultados de desregulação do *IGFBP1* encontrados no presente trabalho, e reforçam a idéia de que a expressão alterada do sistema IGF na endometriose pode ser um dos fatores responsáveis pelo crescimento do tecido ectópico.

O *PAEP* codifica a glicodelina, uma glicoproteína com diversas funções como imunossupressão (Rachmilewitz *et al.*, 2003), contracepção (Oehninger *et al.*, 1995), diferenciação celular e supressão tumoral (Kämäräinen *et al.*, 1997; Koistinen *et al.*, 2005). Considera-se que a expressão desta glicoproteína é mais freqüente em carcinoma ovariano bem diferenciado, sendo mais expressa em estadios tumorais iniciais e associada a um prognóstico favorável (Mandelin *et al.*, 2003). Alguns trabalhos têm associado a expressão da glicodelina e suas funções com doenças ginecológicas malignas e benignas, dentre elas a endometriose (Cornillie *et al.*, 1991; Horowitz *et al.*, 2001). As lesões endometrióticas apresentam menor grau de diferenciação ou retardo neste processo, em relação ao tecido eutópico de mulheres com endometriose (Nisolle *et al.*, 1995; Klemmt *et al.*, 2006). Abrao e colaboradores (2003) também associaram lesões endometrióticas menos diferenciadas com estadios III e IV da doença. Kao e colaboradores (2003) encontraram menor expressão de glicodelina em tecido eutópico de mulheres com endometriose na fase secretora do ciclo menstrual, quando comparado ao endométrio eutópico de pacientes sem endometriose. Neste trabalho, detectamos uma menor expressão do *PAEP* em lesões endometrióticas do que no endométrio eutópico, o que poderia ser um indício de perda de diferenciação nas lesões, relacionada à perda de função da glicodelina.

Portanto, a desregulação dos genes *SPARC*, *MYC*, *MMP3*, *IGFBP1* e *PAEP* causariam perda da homeostase celular nas lesões endometrióticas, contribuindo para a implantação e sobrevivência do tecido ectópico no ambiente extra-uterino. Consideramos que análises de um

número maior de amostras são necessárias, bem como testes para determinar funções gênicas nas lesões para caracterização de sua participação no desenvolvimento da doença.

O endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose compartilham alterações que não são encontradas no endométrio eutópico de mulheres sem endometriose, o que corrobora a idéia de que este endométrio alterado, ao cair na cavidade peritoneal, tem um potencial inicial de desenvolver a endometriose (Sharpe-Timms, 2001). Entretanto, no presente trabalho, quando o grupo controle foi comparado ao endométrio eutópico de pacientes com endometriose, nenhuma diferença significativa foi encontrada nos genes estudados. Um número maior de amostras deve ser analisado para que esses resultados sejam conclusivos.

Os dados discordantes da literatura devem-se primeiramente às diferentes fases do ciclo menstrual analisadas. Em segundo lugar, aos diferentes tipos de lesões avaliadas, e por fim às diferentes técnicas utilizadas na investigação da endometriose. As três variantes, de maneira geral, são consideradas responsáveis pelos resultados inconclusivos sobre o tema.

Em resumo, este projeto disponibilizou ao banco de dados da literatura 291 genes candidatos com expressão gênica desregulada na fase proliferativa inicial do ciclo menstrual em lesões endometrióticas peritoneais e ovarianas. Os genes *SPARC*, *MYC*, *MMP3*, *IGFBP1* e *PAEP* devem ser analisados em um número maior e mais diversificado de amostras, pois podem estar envolvidos com mecanismos de implantação e manutenção dos implantes endometrióticos. A investigação futura desses genes poderá contribuir para a elucidação da fisiopatologia da endometriose.

CONCLUSÕES

- 1) A técnica RaSH foi eficiente em detectar expressão diferencial entre os tecidos eutópico e ectópico da pacientes com endometriose.
- 2) Foram identificados como candidatos 291 genes desregulados nas lesões endometrióticas: 191 superexpressos e 100 menos expressos.
- 3) Entre os genes selecionados após a análise comparativa de expressão nos tecidos eutópico e ectópico, e após validação por técnica de PCR em tempo real, o gene *SPARC* foi superexpresso e os genes *MYC*, *MMP3*, *IGFBP1* e *PAEP* menos expressos nas lesões.
- 4) Diferenças significativas de expressão nas lesões peritoneais foram obtidas para os genes *SPARC*, *MYC*, *IGFBP1*, *PAEP*; e nos endometriomas ovarianos para os genes *MMP3* e *PAEP*.
- 5) Os genes *SPARC* e *IGFBP1* mostraram diferenças significativas de expressão, quando comparamos as lesões peritoneais com as ovarianas.
- 6) Sugerimos que os genes *SPARC*, *MYC*, *MMP3*, *IGFBP1* e *PAEP* estejam envolvidos com mecanismos de implantação e manutenção dos implantes endometrióticos.
- 7) Nossos resultados sugerem que as diferenças observadas entre o endométrio eutópico e as lesões endometrióticas de pacientes afetadas pela endometriose são consequências dos diferentes ambientes endócrinos desses tecidos.

REFERÊNCIAS

- Abrao MS, Neme RM, Carvalho FM, Aldrighi JM, Pinotti JA. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment International. *J Gynecol Obstet* 2003; 82: 31-40.
- Absenger Y, Hess-Stumpp H, Kreft B, Krätzschar J, Haendler B, Schütze N, Regidor AP, Winterhager E. Cyr61, a deregulated gene in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 399-407.
- Adashi EY. Insulin-like growth factors as determinants of follicular fate. *J. Soc. Gynecol. Invest* 1995; 2: 721-726.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-410.
- American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997; 67:817-821.
- Arimoto T, Katagiri T, Oda K, Tsunoda T, Yasugi T, Osuga Y, Yoshikawa H, Nishii O, Yano T, Taketani Y, Nkamura Y. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis. *Int J Oncol* 2003; 22: 551-560.
- Arya P, Shaw R. Endometriosis: Current thinking. *Curr Obstet Gynaecol* 2005; 15: 191–198.
- Beliard A, Donnez J, Nisolle M, Foidart JM. Localization of laminin, fibronectin, E-caderin, and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 67:266-272.
- Birmingham A. Endometriosis and infertility. *Fertil. Steril* 2006; 86: 156-160.
- Bischoff F, Simpson JL. Genetics of endometriosis: heritability and candidate genes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18: 219-232.
- Bradshaw AD, Sage EH. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J. Clin. Invest* 2001; 107: 1049- 1054.
- Braun DP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Dmowski P. Relationship between apoptosis and the number of macrophages in eutopic endometrium from women with and without endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 78: 830-835.
- Briggs J, Chamboredon S, Castellazzi M, Kerry JA, Bos TJ. Transcriptional upregulation of SPARC, in response to c-Jun overexpression, contributes to increased motility and invasion of MCF7 breast cancer cells. *Oncogene* 2002; 21: 7077 – 7091.
- Brosens I. Is mild endometriosis a progressive disease? *Human Reprod* 1994; 9: 2209-2211.
- Brosens I, Puttemans P, Campo R, Gordts S and Kinkel K. Diagnosis of endometriosis: pelvic endoscopy and imaging techniques. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18: 285-303.

- Bruner-Tran KL, Eisenberg E, Yeaman GR, Anderson TA, Mcbean J, Osteen KG. Steroid and Cytokine Regulation of Matrix Metalloproteinase Expression in Endometriosis and the Establishment of Experimental Endometriosis in Nude Mice. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4782–4791.
- Bruner-Tran KL, Zhang Z, Eisenberg E, Winneker RC, Osteen KG. Down-Regulation of Endometrial Matrix Metalloproteinase-3 and -7 Expression in Vitro and Therapeutic Regression of Experimental Endometriosis in Vivo by a Novel Nonsteroidal Progesterone Receptor Agonist, Tanaproget. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1554–1560.
- Campo Mcknight DA, Sosnoski DM, Koblinski JE, Gay CV. Roles of osteonectin in the migration of breast cancer cells into bone. *J Cell Biochem* 2006; 97: 288-302.
- Cook RD, Weisberg S. Transforming a response variable for linearity. *Biometrika* 1994; 81: 731-737.
- Cornillie FJ, Lauweryns JM, Seppälä M, Riittinen L, Koninckx PR. Expression of endometrial protein PP14 in pelvic and ovarian endometriotic implants. *Hum. Reprod.* 1991; 10: 1411–1415.
- Cunha-Filho JSL, Lemos NA, Freitas FM, Kiefer K, Faller M, Passos EP. Insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 and -3 in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2003; 18: 423-428.
- Darrow SL, Vena JE, Batt RE, Zielezny MA, Michalck AM, Selman S. Menstrual cycle characteristics and risk of endometriosis. *Epidemiology* 1993; 4: 135-142.
- D’Hooghe TM, Debrock S, Hill JA, Meuleman C. Endometriosis and subfertility: Is the relationship resolved? *Semin Reprod Med* 2003; 21 :243-254.
- Dinulescu DM, Ince TA, Quade BJ, Shafer SA, Crowley D, Jacks T. Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. *Nat Med* 2005; 11: 63-70.
- Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod* 2001; 16: 1802-1808.
- Donnez J, Smoes P, Gillerot S; Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 1998; 13: 1686-1690.
- El-Ghobashy AA, Herrington CS, Innes J, Prime W, Shaaban AM. Upregulation of heat shock protein 27 in metaplastic and neoplastic lesions of the endocervix. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 503-509.

- El Mahgoud S, Yaseen S. A positive proof for the theory of coelomic metaplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137: 137-140.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment. *Genome Res* 1998; 8: 175-185.
- Eyster KM, Boles AL, Brannian JD, Hansen KA. DNA microarray analysis of gene expression markers of endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77: 38-42.
- Farquhar CM. Extracts from the 'clinical evidence'. *Endometriosis*. *BMJ* 2000; 320: 1449-1452.
- Farquhar CM. *Endometriosis*. *BMJ* 2007; 334: 249-253.
- Flores I, Rivera E, Ruiz LA, Santiago OI, Vernon MW, Caroline B. Molecular profiling of experimental endometriosis identified gene expression patterns in common with human disease. *Fertil Steril* 2007; 87: 1180-1198.
- Foster WG. Do environmental contaminants adversely affect human reproductive physiology? *J Obstet Gynaecol* 2003; 25: 33-44.
- Framson PE, Sage EH. SPARC and Tumor Growth: Where the Seed Meets the Soil? *Journal of Cellular Biochemistry* 2004; 92: 679-690.
- Fujii S. Secondary mullerian system and endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 219-225.
- Gaetje R, Kotzian S, Hermann G, Baumann R, Starzinski-Powitz A. Invasiveness of endometriotic cells in vitro. *Lancet* 1995; 346: 1463-1464.
- García-Manero M, Alcazar JL, Toledo G. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and ovarian endometriosis: correlation between VEGF serum levels, VEGF cellular expression, and pelvic pain. *Fertil Steril* 2007; 88: 513-515.
- Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD, Fisher SJ. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 2003; 299: 405-408.
- Gilabert-Estellés J, Estellés A, Gilabert J, Castelló R, España F, Falcó C, Romeu A, Chirivella M, Zorio E, Aznar J. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Hum Reprod* 2003; 18: 1516-1522.
- Giudice LC, Dsupin BA, Gargosky SE, Rosenfeldt RG, Irwin JC. The Insulin-Like Growth Factor System in Human Peritoneal Fluid: Its Effects on Endometrial Stromal Cells and Its Potential Relevance to Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1294-1293.
- Giudice LC, Kao LC, Yang J, Taylor RN, Osteen K, Lessey BD. Global Gene Expression Profiling of Human Endometrium from Women with Endometriosis using Genechip

- Microarray Technology (abstract). In NICHD Conference on endometriosis: Emergin Research and Intervention Strategies 2001, Bethesda, MD: 62-63.
- Giudice LC, Dsupin BA, Jin IH, Vu TH, Hoffman AR. Differential expression of mRNAs encoding insulin-like growth factors and their receptors in human endometrium and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 76: 1115-1123.
- Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004; 364:1789-99.
- Goffin F, Munaut C, Frankenne F, Perrier D'Hauterive S, Béliard A, Fridman V, Nervo P, Colige A, Foidart JM. Expression patter of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. *Biol Reprod* 2003; 69: 976-984.
- Gogusev J, Bouquet de Joliniere J, Telvi L, Doussau M, du Manoir S, Stojkoski A, Levardon M. Detection of DNA copy number changes in human endometriosis by comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 1999; 105: 444-451.
- Gogusev J, Bouquet de Joliniere J, Telvi L, Doussau M, du Manoir S, Stojkoski A, Levardon M. Genetic abnormamalties detected by comparative genomic hybridization in human endometriosis-derived cell line. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 821-827.
- Green P. PHRAD documentation. <http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>. 1996. University of Washington, Seattle.
- Grimes GR, Wen TQ, Mewissen M, Baxter RM, Moodie S, Beattie JS, Ghazal P. PDQ Wizard: automated prioritization and characterization of gene and protein lists using biomedical literature. *Bioinformatics* 2006; 22: 2055–2057.
- Halme J, Hammond M, Hulka J, Raj S, Talbert L. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 151-154.
- Harada T, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, Paschopoulos M, Paraskevaidis E, Terakawa N. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 29-38.
- Heaps J, Nieberg R, Berek J. Malignant neoplasms arising in endometriosis. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 1023-1028.
- Hirata J, Kikuchi Y, Imaizumi E, Tode T, Nagata I. Endometriotic tissues produce immunosuppressive factors. *Gynecol Obstet Invest* 1994; 37: 43-47.
- Hoffman B, Liebermann DA. The proto-oncogene c-myc and apoptosis. *Oncogene* 1998; 17: 3351-3357.

- Horowitz IR, Cho C, Song M, Flowers LC, Santanam N, Parthasarathy S, Ramachandran S. Increased glycodelin levels in gynecological malignancies. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2001; 11: 173–179.
- Houston DE. Evidence for the risk of pelvic endometriosis by age, race and socioeconomic status. *Epidemiol Rev* 1984; 6:167-191.
- Hu W, Tay SK, Zhao Y. Endometriosis-specific genes identified by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction expression profiling of endometriosis *versus* autologous uterine endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 228–238.
- Hubank M, Schatz DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res.* 1994, 22: 5640-5648.
- Irwin JC, De las Fuentes L, Dsupin BA, Giudice LC. Insulin-like growth factor (IGF) regulation of human endometrial stromal cell function: coordinate effects on IGF binding protein-1, cellular proliferation, and prolactin secretion. *Regul Peptides* 1993; 48: 165-77.
- Jiang H, Fisher PB. Use of a sensitive and efficient subtraction hybridization protocol for the identification of genes differentially regulated during the induction of differentiation human melanoma cells. *Mol. Cell. Differ* 1993; 1: 285-299.
- Jiang H, Kang D, Alexandre D, Fisher PB. RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. *Proc Nat Acad Sci USA* 2000; 97: 12684-12689.
- Johnson MC, Torres M, Alves A, Bacallao K, Fuentes A, Vega M, Boric MA. Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: Expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 45-52.
- Juin P, Hueber AO, Littlewood T, Evan G. c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes* 1999; 13: 1367–1381.
- Kämäräinen M, Seppälä M, Virtanen I, Andersson LC. Expression of glycodelin in MCF-7 breast cancer cells induces epithelial differentiation into organized acinar epithelium. *Lab. Invest.* 1997; 77: 565-573.
- Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Osteen K, Lessey BA, Giudice LC. Expression Profiling of Endometrium from Women with Endometriosis Reveals Candidate Genes for Disease-Based Implantation Failure and Infertility. *Endocrinology* 2003; 144: 2870-2881.
- Kato Y, Lewalle JM, Baba Y, Tsukuda M, Sakai N, Baba M, Kobayashi K, Koshika S, Nagashima Y, Frankenne F, Noël A, Foidart JM, Hata RI. Induction of SPARC by VEGF

- in Human Vascular Endothelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 422–426.
- Kato N, Sasou S, Motoyama T. Expression of hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. *Mod Pathol* 2006; 19: 83-89.
- Kim JJ, Taylor HS, Lu Z, Ladhani O, Hastings JM, Jackson KS, Wu Y, Guo SW, Fazleabas AT. Altered expression of HOXA10 in endometriosis: potential role in decidualization. *Mol Hum Reprod* 2007; 13: 323-332.
- Klemmt PA, Carver JG, Kennedy SH, Koninckx PR, Mardon HJ. Stromal cells from endometriotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity. *Fertil Steril* 2006; 85: 564-572.
- Koistinen H, Seppälä M, Nagy B, Tapper J, Knuutila S, Koistinen R. Glycodelin reduces carcinoma-associated gene expression in endometrial adenocarcinoma cells. *Am. J. Obst. Gynecol* 2005, 193: 1955-1960.
- Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH. Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 741-751.
- Kruitwagen RF, Poels LG, Willemsen WN, DeRonge IJ, Jap PH, Rolland R. Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertil Steril* 1991; 55: 297-303.
- Kusume T, Maeda N, Izumiya C, Yamamota Y, Hayashi K, Oguri H, Nishimori Y, Fukaya T. Human leukocyte antigen expression by peritoneal macrophages from women with pelvic endometriosis is depressed but coordinated with costimulatory molecule expression. *Fertil Steril* 2005; 83: 1232-1240.
- Kyama CM, T'Jampens D, Mihalyi A, Simsa P, Debrock S, Waelkens E, Landuyt B, Meuleman C, Fulop V, Mwenda JM, D'Hooghe TM.. ProteinChip technology is a useful method in the pathogenesis and diagnosis of endometriosis: a preliminary study. *Fertil Steril* 2006; 86: 203-209.
- Laschke MW, Menger MD. *In vitro* and *in vivo* approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2007; 4: 331-342.
- Lau LF, Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res* 1999; 248: 44–57.
- Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil. Steril.* 2001; 75: 1-9.

- Lebovic DI, Baldocchi RA, Mueller MD, Taylor RN. Altered expression of a cell-cycle suppressor gene, Tob-1, in endometriosis cell by cDNA array analyses. *Fertil Steril* 2002; 78: 849-854.
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Buck CA, Schinnar R, Bilker W, Strom BL. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 643-649.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001; 25:402-8.
- Mandelin E, Lassus H, Seppälä M, Leminen A, Gustafsson J-A, Cheng G, Bützow R, Koistinen R. Glycodelin in Ovarian Serous Carcinoma: Association with Differentiation and Survival. *Cancer Res.* 2003; 63: 6258-6264.
- Matsuzaki S, Canis M, Murakami T, Dechelotte P, Bruhat MA, Okamura K. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in eutopic endometrium and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 75: 956-960.
- Matsuzaki S, Canis M, Vaurs-Barrière C, Pouly JL, Boespflug-Tanguy O, Penault-Llorca F, Dechelotte P, Dastugue B, Okamura K, Mage G. DNA microarray analysis of gene expression profiles in deep endometriosis using laser capture microdissection. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 719-728.
- Matsuzaki S, Canis M, Vaurs-Barrière C, Boespflug-Tanguy O, Dastugue B, Mage G. DNA microarray analysis of gene expression in eutopic endometrium from patients with deep endometriosis using laser capture microdissection. *Fertil Steril* 2005; 84: 1180-1190.
- Matsuzaki S, Canis M, Darcha C, Déchelotte PJ, Pouly JL, Mage G. Expression of WT1 is down-regulated in eutopic endometrium obtained during the midsecretory phase from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2006; 86: 554-558.
- Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M, Rumi LS. Apoptosis and expression of Bcl-2, Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000; 74: 760-766.
- Missmer SA, Cramer DW. The epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2003; 30: 1-19.
- Mitchell KO, Ricci MS, Miyashita T, Dicker DT, Jin Z, Reed JC, El-Deiry WS. Bax Is a Transcriptional Target and Mediator of c-Myc-induced Apoptosis. *Cancer Res* 2000; 60: 6318-6325.

- Montagna P, Capellino S, Villaggio B, Remorgida V, Ragni N, Cutolo M, Ferrero S. Peritoneal fluid macrophages in endometriosis: correlation between the expression of estrogen receptors and inflammation. *Fertil Steril* 2007; in press.
- Mounsey AL, Wilgus A, Slawson DC. Diagnosis and management of endometriosis. *Am Fam Physician* 2006; 74: 594-600.
- Moussad EE, Brigstock DR. Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab* 2000; 71: 276-92.
- Nagase H, Woessner, JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-21494.
- Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Evers JLH, Dunselman GAJ. Pathogenesis of endometriosis. *Best Practic. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2004; 18: 233-244.
- Ngo TH, Barnard RJ, Leung PS, Cohen P, Aronson WJ. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein-1 modulate prostate cancer cell growth and apoptosis: possible mediators for the effects of diet and exercise on cancer cell survival. *Endocrinology* 2003; 144: 2319-2324.
- Nisolle M, Casanas R, Ana V, Mine JM, Donnez J. Morphometric study of stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 59: 681-684.
- Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J. Coexpression of cytokeratin and vimentin in eutopic endometrium and endometriosis throughout the menstrual cycle: evaluation by a computerized method. *Fertil Steril* 1995; 64: 69-75.
- Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997; 68: 585-596.
- Oehninger S, Coddington CC, Hodgen GD, Seppälä M. Factors affecting fertilization: endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Fertil. Steril* 1995; 63: 377-383.
- Olive D, Henderson DY. Endometriosis and mullerian anomalies. *Obstet Gynecol* 1987; 69: 783-790.
- Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991; 56: 45-51.
- Osuga Y, Koga K, Tsutsumi O, Igarashi T, Okagaki R, Takai Y, Matsumi H, Hiroi H, Fujiwara T, Momoeda M, Yano T, Taketani Y. Stem cell factor (SCF) concentrations in peritoneal fluid of women with or without endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44: 231-235.

- Poliness AE, Healey MG, Brennecke SP, Moses EK. Proteomic approaches in endometriosis research. *Proteomics* 2004; 4: 1897-1902.
- Rachmilewitz J, Borovsky Z, Riely GJ, Miller R, Tykocinski ML. Negative regulation of T cell activation by placental protein 14 is mediated by the tyrosine phosphatase receptor CD45. *J. Biol. Chem* 2003; 278: 14059–14065.
- Rageh MAE, Moussad EE-DA, Wilson AK, Brigstock DR. Steroidal regulation of connective tissue growth factor (CCN2; CTGF) synthesis in the mouse uterus. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2001; 54: 338–346.
- Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Syitek C, Gorstein F, Osteen KG. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 1994; 94: 946-953.
- Rosa e Silva ACJS, Rosa e Silva JC, Ferriani RA. Serum CA-125 in the diagnosis of endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2007; 96: 206-207.
- Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14: 422-429.
- Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. Structure of Bcl-xL-BaK peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 1997; 225: 983-986.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 2000; 285: 194-204.
- Semino C, Semino A, Pietra G, Mingari MC, Barocci S, Venturini PL, Ragni N, Melioli G. Role of major histocompatibility complex class I expression and natural killer-like T cells in the genetic control of endometriosis. *Fertil Steril* 1995; 64: 909-916.
- Sharpe-Timms K. Endometrial Anomalies in Women with Endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2001; 943: 131-147.
- Siristatidis C, Nissotakis C, Chrelias C, Iacovidou H, Salamalekis E. Immunological factors and their role in the genesis and development of endometriosis. *J Obstet Gynaecol* 2006; 32: 162-170.
- Smit DJ, Gardiner BB, Sturm RA. Osteonectin downregulates E-cadherin induces osteopontin and focal adhesion kinase activity stimulating an invasive melanoma phenotype. *Int J Cancer* 2007; 121: 2653-2660.

- Somigliana E, Viganò P, Filardo P, Candiani M, Vignali M, Panina Bordignon P. Use of knockout transgenic mice in the study of endometriosis: insights from mice lacking beta(2)-microglobulin and interleukin-12p40. *Fertil Steril*. 2001; 75: 203-206.
- Subramanian A, Sharma AK, Banerjee D, Jiang WG, Mokbel K. Evidence for a tumour suppressive function of IGF1-binding proteins in human breast cancer. *Anticancer Res* 2007; 27: 3513-3518.
- Tang XM, Rossi MJ, Masterson BJ, Chegini N. Insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-I receptors, and IGF binding proteins 1-4 in human uterine tissue: tissue localization and IGF-I action in endometrial stromal and myometrial smooth muscle cells in vitro. *Biol Reprod* 1994; 50: 1113-1125.
- Taylor RN, Lebovic DI, Meuller MD. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2001; 955: 89-100.
- Taylor RN, Lundeen SG, Giudice LC. Emerging role of genomics in endometriosis research. *Fertil Steril* 2002; 78: 694-698.
- Thomas EJ, Prentice A. The aetiology and pathogenesis of endometriosis. *Reprod Med Rev* 1992; 1: 21-36.
- Thomas EJ. Endometriosis, 1995 – confusion or sense? *Int J Gynecol Obstet* 1995; 48: 149-155.
- Thompson EB. The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 575-600.
- Ulukus M, Cakmak H, Arici A. The role of endometrium in endometriosis. *J Soc Gynecol Invest* 2006; 13: 467-476.
- Uzan C, Cortez A, Dufournet C, Fauvet R, Siffroi JP, Daraï E. Eutopic endometrium and peritoneal, ovarian and bowel endometriotic tissues express a different profile of matrix metalloproteinases-2, -3 and -11, and of tissue inhibitor metalloproteinases-1 and -2. *Virchows Arch* 2004; 445: 603-609.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial Analysis of Gene Expression. *Science* 1995; 270: 484-487.
- Vercellini P, Bocciolone L, Vendola N, Columbo A, Rognoni MT, Fedele L. Peritoneal endometriosis. Morphologic appearance in women with chronic pelvic pain. *J Reprod Med* 1991; 36: 533-536.
- Vercellini P, Parazzini F, Bolis G, Carinelli S, Dindelli M, Vendola N, Luchini L, Crosignani PG. Endometriosis and ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 181-182.

- Vercellini P, De Giorgio O, Aimi G, Panazza S, Uglietti A, Crosignani PG. Menstrual characteristic in women with and without endometriosis. *Obstet Gynecol* 1997; 90: 264-268.
- Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Practic. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2004; 18: 177-200.
- Viganò P, Somigliana E, Chiodo I, Abbiati A, Vercellini P. Molecular mechanisms and biological plausibility underlying the malignant transformation of endometriosis: a critical analysis. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 77-89.
- Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P. Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001, 96:21-34.
- Wagner AJ, Small MB, Hay N. Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of Bcl-2. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13: 2432–2440.
- Witz CA. Cell adhesion molecules and endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003; 21: 173-182.
- Wu Y, Kajdacsy-Balla A, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Jailwala P, Wang Y, Wang X, Ghosh S, Guo SW. Transcriptional characterizations of differences between eutopic and ectopic endometrium. *Endocrinol* 2006; 147: 232-246.
- Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the bcl-2 family and cell death. *Blood* 1996; 88: 386–401.
- Yang W-CV, Chen H-W, Au H-K, Chang C-W, Huang C-T, Yen Y-H, Tzeng C-R. Serum and endometrial markers. *Best Practic. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2004; 18: 177-200.
- Zeitoun KM, Bulun SE. Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 1999; 72: 961-969.
- Zhou XD, Xiong MM, Tan FK, Guo XJ, Arnett FC. SPARC, an Upstream Regulator of Connective Tissue Growth Factor in Response to Transforming Growth Factor β Stimulation. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3885–3889.

ANEXOS

ANEXO A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Fls. N.	38
Proc. N.	11736/04
Rub.	

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 10 de dezembro de 2004

Ofício nº 3384/2004
CEP/SPC

Prezada Senhora:

O trabalho intitulado **“ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL POR RaSH (RAPID SUBTRACTION HYBRIDIZATION) DE PACIENTES COM ENDOMETIROSE”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 194ª Reunião Ordinária realizada em 06/12/2004, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 11736/2004.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
JULIANA MEOLA(Orientanda)
PROFª DRª LÚCIA REGINA MARTELLI(Orientadora)
Depto. de Genética - FMRP-USP
Em mãos

ANEXO B

Tabela I: Sequências contaminantes e demais classificações (Ribossomal, *EST* Humana e *UniGene*)

MITOCONDRIAL			
Nº Acesso	Descrição	RHENDN	RHENEN
J01415	Human mitochondrion, complete genome	176	39
		176	39
EST LEVEDURA			
Nº Acesso	Descrição	RHENDN	RHENEN
T36983	T36983 EST102025 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cDNA 3' end. 1/95		1
T38386	T38386 EST103859 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cDNA 3' end. 1/95		2
		0	3
UNIGENE			
Nº Acesso	Descrição	RHENDN	RHENEN
CN484301	tgnl UG Hs#S19724297 hw45c10.y2 Human primary human ocular pericytes. Unamplified (hw) Homo sapiens cDNA clone hw45c10 5', mRNA sequence /clone=hw45c10 /clone_end=5' /gb=CN484301 /gi=46565805 /ug=Hs.268803 /len=618		1
XM_498557	tgnl UG Hs#S21593118 PREDICTED: Homo sapiens LOC440123 (LOC440123), mRNA /cds=p(1,363) /gb=XM_498557 /gi=51471158 /ug=Hs.585252 /len=2284		1
AK074908	tgnl UG Hs#S4806911 Homo sapiens cDNA FLJ90427 fis, clone NT2RP3000481, highly similar to Homo sapiens RanBP7/importin 7 mRNA /gb=AK074908 /gi=22760659 /ug=Hs.523470 /len=3781	1	
BX641108	tgnl UG Hs#S16819761 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp779O0231 (from clone DKFZp779O0231) /gb=BX641108 /gi=34365429 /ug=Hs.5724 /len=3994		1
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
BG254392	tgnl UG Hs#S3226548 602368978F1 NIH_MGC_91 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4477195 5', mRNA sequence /clone=IMAGE:4477195 /clone_end=5' /gb=BG254392 /gi=12764208 /ti=44312233 /ug=Hs.536415 /len=1174		1
BU177744	tgnl UG Hs#S4753448 AGENCOURT_7984442 NIH_MGC_72 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6166598 5', mRNA sequence /clone=IMAGE:6166598 /clone_end=5' /gb=BU177744 /gi=22691728 /ti=158177112 /ug=Hs.581964 /len=873		1
AK126809	tgnl UG Hs#S16885895 Homo sapiens cDNA FLJ44859 fis, clone BRALZ2003330 /gb=AK126809 /gi=34533443 /ug=Hs.293884 /len=1790		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	1	
AJ318805	tgnl UG Hs#S4013186 AJ318805 Homo sapiens adipose tissue Homo sapiens cDNA clone 2040, mRNA sequence /clone=2040 /gb=AJ318805 /gi=18141682 /ug=Hs.86538 /len=5223	2	
CR749357	tgnl UG Hs#S21592430 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp779K1237 (from clone DKFZp779K1237) /cds=p(249,1814) /gb=CR749357 /gi=51476439 /ug=Hs.239818 /len=3237	1	
BG832050	tgnl UG Hs#S3617992 602765051F1 NIH_MGC_42 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4907125 5', mRNA sequence /clone=IMAGE:4907125 /clone_end=5' /gb=BG832050 /gi=14179637 /ti=45245335 /ug=Hs.588885 /len=848	1	
CR604926	tgnl UG Hs#S21297145 full-length cDNA clone CS0DF038YH05 of Fetal brain of Homo sapiens (human) /gb=CR604926 /gi=50485733 /ug=Hs.197922 /len=1566	2	
AL831995	tgnl UG Hs#S4623373 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp451J163 (from clone DKFZp451J163) /gb=AL831995 /gi=21732534 /ug=Hs.268675 /len=5411	1	
AB014581	tgnl UG Hs#S1090801 Homo sapiens mRNA for KIAA0681 protein, partial cds /cds=p(1,1618) /gb=AB014581 /gi=3327175 /ug=Hs.300863 /len=4323	1	
NM_001025	tgnl UG Hs#S1727727 Homo sapiens ribosomal protein S23 (RPS23), mRNA /cds=p(94,525) /gb=NM_001025 /gi=71772514 /ug=Hs.567333 /len=3325	1	
AY283618	tgnl UG Hs#S15730155 Homo sapiens hypothetical protein mRNA, complete cds /cds=p(72,4766) /gb=AY283618 /gi=30908949 /ug=Hs.136102 /len=6409	1	
AL833852	tgnl UG Hs#S4621549 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761G0111 (from clone DKFZp761G0111) /cds=p(1,1197) /gb=AL833852 /gi=21739329 /ug=Hs.477921 /len=4792	2	
AB007940	tgnl UG Hs#S1244987 Homo sapiens mRNA for KIAA0471 protein, partial cds /cds=p(284,1525) /gb=AB007940 /gi=3413903 /ug=Hs.495391 /len=6834	1	
CA437837	tgnl UG Hs#S6143167 UI-H-DH0-aur-e-06-0-UI.s1 NCI_CGAP_DH0 Homo sapiens cDNA clone UI-H-DH0-aur-e-06-0-UI 3', mRNA sequence /clone=UI-H-DH0-aur-e-06-0-UI /clone_end=3' /gb=CA437837 /gi=24802257 /ug=Hs.159204 /len=691	1	
AF146796	tgnl UG Hs#S2333428 Homo sapiens sodium dependent phosphate transporter isoform NaPi-IIb mRNA, complete cds /cds=p(36,2105) /gb=AF146796 /gi=6910977 /ug=Hs.479372 /len=4135	1	
AL050204	tgnl UG Hs#S1570007 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586F1223 (from clone DKFZp586F1223) /gb=AL050204 /gi=4884443 /ug=Hs.28540 /len=1655	1	
		4	21

OUTRAS NÃO REDUNDANTES

Nº Acesso	Descrição	RHENDN	RHENEN
XP_519919	PREDICTED: exostosin 1 [Pan troglodytes]		1

Continuação			
AAL31950	CDH1-D [Gallus gallus]	1	
		1	1
RIBOSSOMAL			
Nº Acesso	Descrição	RHENDN	RHENEN
NM_021104	Homo sapiens ribosomal protein L41 (RPL41), transcript variant 1, mRNA	1	
NM_000991	Homo sapiens ribosomal protein L28 (RPL28), mRNA	2	
NM_000967	Homo sapiens ribosomal protein L3 (RPL3), transcript variant 1, mRNA	3	
NM_007104	Homo sapiens ribosomal protein L10a (RPL10A), mRNA		6
NM_000988	Homo sapiens ribosomal protein L27 (RPL27), mRNA		4
NM_001015	Homo sapiens ribosomal protein S11 (RPS11), mRNA		8
NM_000989	Homo sapiens ribosomal protein L30 (RPL30), mRNA		10
NM_001035006	Homo sapiens ribosomal protein L17 (RPL17), transcript variant 2, mRNA		3
NM_000979	Homo sapiens ribosomal protein L18 (RPL18), mRNA		1
NM_000981	Homo sapiens ribosomal protein L19 (RPL19), mRNA		4
NM_000971	Homo sapiens ribosomal protein L7 (RPL7), mRNA tgnl UG Hs#S1727727 Homo sapiens ribosomal protein S23 (RPS23), mRNA /cds=p(94,525) /gb=Nm_001025 /gi=71772514 /ug=Hs.567333 /len=3325		1
NM_001025			18
NM_000970	Homo sapiens ribosomal protein L6 (RPL6), mRNA		10
NM_022551	Homo sapiens ribosomal protein S18 (RPS18), mRNA		3
NM_000987	Homo sapiens ribosomal protein L26 (RPL26), mRNA		1
NM_001012	Homo sapiens ribosomal protein S8 (RPS8), mRNA		6
NM_000661	Homo sapiens ribosomal protein L9 (RPL9), mRNA		4
NM_001007	Homo sapiens ribosomal protein S4, X-linked (RPS4X), mRNA		1
U09953	gp U09953 1323733 E3F957CA13F7BFEF ribosomal protein L9 [Homo sapiens]		10
AL049597	gp AL049597 10443242 28AB564EA6F7F504 dJ612B15.1 (novel protein similar to 60S ribosomal protein L17 (RPL17)) [Homo sapiens]		4
AB007158	gp AB007158 3088342 E6A62203E15257C1 ribosomal protein S23 [Homo sapiens]	1	21
BC000606	tn BC000606 AAH00606 5C859DBA21287948 Similar to ribosomal protein L14.[Homo sapiens]		1
L07287	gp L07287 292435 049D53AB5F7B46B6 ribosomal protein L26 [Homo sapiens]	2	4
L16558	gp L16558 307388 A6EEB4DFC83C6F96 ribosomal protein L7 [Homo sapiens]		3
U76609	gp U76609 1658578 1D1E47A337A71ADC ribosomal L5 protein [Homo sapiens]		1
M90054	gp M90054 337580 E9F238D9F8CA0D67 ribosomal protein L3 [Homo sapiens]	6	

		Continuação	
BC000802	tn BC000802 AAH00802 E9CE3CBD59524F81 Similar to ribosomal protein S9.[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]		7
		16	136
<i>EST HUMAN</i>			
Nº Acesso	Descrição	RHENDN	RHENEN
CR736145	CR736145 Homo sapiens library (Ebert L) Homo sapiens cDNA clone IMAGp998K151889 ; IMAGE:767750 5', mRNA sequence		1
BG620235	602618512F1 NIH_MGC_79 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4732082 5', mRNA sequence		1
BI003963	PM0-HN0078-150201-006-h03 HN0078 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence		2
CN359804	17000600087525 GRN_PRENEU Homo sapiens cDNA 5', mRNA sequence		1
DB013855	DB013855 TESOP2 Homo sapiens cDNA clone TESOP2002507 5', mRNA sequence	1	
CA445375	UI-H-ED0-axn-c-09-0-UI.s1 NCI_CGAP_ED0 Homo sapiens cDNA clone UI-H-ED0-axn-c-09-0-UI 3', mRNA sequence	1	
CV394835	QV3-CT0556-041000-370-f06 CT0556 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence	1	
DA274667	DA274667 BRCOC2 Homo sapiens cDNA clone BRCOC2001106 5', mRNA sequence		1
CX753754	AGENCOURT_41387044 NIH_MGC_281 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:7779333 5', mRNA sequence		2
CB216464	NISC_nq05d07.y1 NICHHD_HS_Ut2 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5938212 5', mRNA sequence	1	
BF678057	602085103F1 NIH_MGC_83 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4249321 5', mRNA sequence	1	
BX091607	BX091607 Soares_testis_NHT Homo sapiens cDNA clone IMAGp998F024495 ; IMAGE:1837825, mRNA sequence		1
AW956406	EST368476 MAGE resequences, MAGD Homo sapiens cDNA, mRNA sequence		1
AI056701	oy53e02.x1 NCI_CGAP_Brn23 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1669562 3' similar to contains Alu repetitive element;, mRNA sequence		2
CA446906	UI-H-ED1-axv-o-23-0-UI.s1 NCI_CGAP_ED1 Homo sapiens cDNA clone UI-H-ED1-axv-o-23-0-UI 3', mRNA sequence		1
CV347023	MR2-CI0127-051200-009-g03 CI0127 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence	1	
BX118116	BX118116 Soares placenta Nb2HP Homo sapiens cDNA clone IMAGp998K21214 ; IMAGE:143756, mRNA sequence	1	
AL521622	AL521622 Homo sapiens NEUROBLASTOMA COT 10-NORMALIZED Homo sapiens cDNA clone CS0DB003YG18 5-PRIME, mRNA sequence		1
BP417704	BP417704 Homo sapiens small intestine Homo sapiens cDNA clone HIE00750r 3', mRNA sequence		2
CV341138	MR0-GN0025-250800-001-a03 GN0025 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence	1	
CB853216	UI-CF-FN0-agd-o-24-0-UI.s1 UI-CF-FN0 Homo sapiens cDNA clone UI-CF-FN0-agd-o-24-0-UI 3', mRNA sequence		1

		Continuação	
AV747712	AV747712 NPC Homo sapiens cDNA clone NPCCPH06 5', mRNA sequence	1	
		8	18
BACTÉRIA			
Nº Acesso	Descrição	RHENDN	RHENEN
U00096	Escherichia coli K-12 MG1655 complete genome	2	4
		2	4
		207	222

ANEXO C

Tabela II: Sequências consideradas como falso-positivas

<i>RefSeq</i>				
Nº Acesso	Descrição	Símbolo	RHENDN	RHENEN
NM_147780	cathepsin B	<i>CTSB</i>	9	1
NM_001002	ribosomal protein, large, P0	<i>RPLP0</i>	8	1
NM_021034	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	<i>IFITM3</i>	2	1
XM_934326	PREDICTED: similar to eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, transcript variant 16	<i>LOC653352</i>	2	1
NM_002775	protease, serine, 11 (IGF binding)	<i>PRSS11</i>	1	1
NM_013230	CD24 molecule	<i>CD24</i>	1	1
XM_937409	PREDICTED: zinc finger protein 516	<i>ZNF516</i>	1	1
NM_005016	poly(rC) binding protein 2	<i>PCBP2</i>	1	2
NM_005801	putative translation initiation factor	<i>SUI1</i>	1	2
NM_002567	prostatic binding protein	<i>PBP</i>	1	2
NM_003746	dynein, cytoplasmic, light polypeptide 1	<i>DNCL1</i>	1	2
NM_005004	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 8, 19kDa	<i>NDUFB8</i>	1	3
NM_000090	collagen, type III, alpha 1	<i>COL3A1</i>	5	3
NM_021103	thymosin, beta 10	<i>TMSB10</i>	3	4
NM_001009	ribosomal protein S5	<i>RPS5</i>	3	5
NM_002489	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, 9kDa	<i>NDUFA4</i>	1	7
NM_021109	thymosin, beta 4, X-linked	<i>TMSB4X</i>	1	8
NM_001021	ribosomal protein S17	<i>RPS17</i>	2	9
NM_000998	ribosomal protein L37a	<i>RPL37A</i>	1	10
			45	64

Tabela IV: Classificação dos genes superexpressos e menos expressos quanto suas funções em processos biológicos.

PROCESSO BIOLÓGICO	GENES SUPEREXPRESSOS	QUANTIDADE	GENES MENOS EXPRESSOS	QUANTIDADE
positive regulation of MAPKKK cascade	<i>NENF</i>	1		0
cellular homeostasis	<i>PRKCB1, SLC40A1, CLN5, CLNS1A, TPT1, PLN</i>	6	<i>MYC</i>	1
ATP synthesis coupled proton transport	<i>ATP6V1E1, ATP5E</i>	2	<i>ATP6V0B</i>	1
DNA ligation		0	<i>XRCC6</i>	1
DNA recombination	<i>SFPQ</i>	1	<i>XRCC6</i>	1
DNA repair	<i>SFPQ</i>	1	<i>XRCC6</i>	1
DNA replication	<i>CTGF, NAP1L1</i>	2		0
ER to Golgi vesicle-mediated transport		0	<i>KDELRI</i>	1
ER-associated protein catabolism	<i>UBA52</i>	1		0
NLS-bearing substrate import into nucleus	<i>KPNA1</i>	1		0
Notch receptor processing		0	<i>NCSTN</i>	1
RNA splicing	<i>SFRS7, SFPQ</i>	2	<i>SF3B3</i>	1
Wnt receptor signaling pathway	<i>SFRP4, RSPO3</i>	2		0
actin filament polymerization	<i>GSN</i>	1		0

continua

				continuação
actin filament severing	<i>GSN</i>	1		0
activation of JNK activity		0	<i>PTPLAD1</i>	1
activation of MAPK activity		0	<i>CD81</i>	1
acute-phase response		0	<i>SERPINA1</i>	1
amino acid metabolism	<i>ATF4</i>	1		0
amino acid transport		0	<i>SLC3A2</i>	1
amyloid precursor protein catabolism		0	<i>NCSTN</i>	1
anaerobic glycolysis	<i>LDHB</i>	1	<i>LDHA</i>	1
angiogenesis	<i>VEGFA, CTGF</i>	2		0
anion transport	<i>VDAC2</i>	1		0
anti-apoptosis	<i>ANXA1, TPT1, CIAPIN1</i>	3	<i>HSPB1, HSPA5</i>	2
antigen processing and presentation		0	<i>HLA-C</i>	1
apoptosis	<i>BRE, DAPK1, CIAPIN1</i>	3	<i>DAP, C8orf4, MYC</i>	3
asparagine biosynthesis	<i>ASNSD1</i>	1		0
aspartyl-tRNA aminoacylation		0	<i>DARS</i>	1
autophagy	<i>ATG3</i>	1		0
axon guidance	<i>UBA52</i>	1		0

				continuação
axonogenesis	<i>S100A6</i>	1		0
barbed-end actin filament capping	<i>GSN</i>	1	<i>SPTBN1</i>	1
behavior		0	<i>FOSB</i>	1
blood coagulation	<i>GNAQ, CD59</i>	2		0
calcium ion homeostasis	<i>TPT1</i>	1		0
calcium ion transport	<i>ITPR1, PLN, TPT1</i>	3	<i>SLC3A2</i>	1
carbohydrate metabolism	<i>PPP1CB</i>	1	<i>SLC3A2, H6PD, GANAB</i>	3
cell adhesion	<i>CD47, CTGF, KITLG, SCARB2, LPP, PARVA, VEZT, TRIP6, CFDP1, GPNMB, LAMA2, CD93</i>	12	<i>TGFBI, LAMB3, TSPAN1, COL6A3, CDH11, ILK</i>	6
cell cycle arrest	<i>CDKN1B</i>	1	<i>MYC</i>	1
cell division	<i>PPP1CB</i>	1	<i>TXNL4A, SPECC1L</i>	2
cell growth		0	<i>SLC3A2</i>	1
cell migration	<i>VEGFA, TRIP6, CXCL16, GNA13, UBA52, CTGF, LAMA2</i>	7		0
cell motility	<i>ANXA1, TPM1, CTGF, TSPAN3, GNA13, CALD1, CDKN1B, TRIP6, CXCL16, VEGFA, UBA52, LAMA2</i>	12	<i>HSPB1, TSPAN1</i>	2
cell proliferation	<i>MITF, CDKN1B, S100A6, TSPAN3, CFDP1, KITLG, ANXA1, VEGFA, GPNMB, BMPR2, PPP1CB, NAP1L1</i>	12	<i>TGFBI, GRN, MYC, TSPAN1, ILK, CD81</i>	6
cell-cell adhesion	<i>CD93, VEZT, CTGF</i>	3	<i>CDH11</i>	1
cell-cell signaling	<i>S100A6, ALDH5A1, UBA52, MAPK1, GNAQ</i>	5	<i>GRN</i>	1

				continuação
cell-matrix adhesion	<i>CD47, TRIP6, CTGF</i>	3	<i>ILK</i>	1
cellular lipid metabolism	<i>GNPAT</i>	1		0
central nervous system development	<i>ALDH5A1</i>	1	<i>ATN1</i>	1
ceramide metabolism		0	<i>NSMAF</i>	1
chemotaxis	<i>CXCL16, MAPK1</i>	2	<i>CMTM7</i>	1
chloride transport	<i>CLNS1A</i>	1		0
chromatin modification	<i>MORF4L1</i>	1		0
ciliary or flagellar motility		0	<i>HLA-C</i>	1
circulation'	<i>CLNS1A, PLN</i>	2		0
collagen catabolism'		0	<i>MMP3, MMP7, MMP10</i>	3
collagen fibril organization	<i>LUM</i>	1		0
complement activation, classical pathway	<i>C1S</i>	1	<i>C4BPA, C1R</i>	2
development	<i>ID1, ID2, CFDP1, MITF</i>	4	<i>PAEP, FOSB</i>	2
dopamine metabolism	<i>ALDH5A1</i>	1		0
endocytosis	<i>RAB5A</i>	1		0
entry of virus into host cell		0	<i>CD81</i>	1
epidermis development	<i>CTGF</i>	1	<i>COL1A1, LAMB3</i>	2

				Continuação
ethanol oxidation	<i>ADH5</i>	1		0
ether lipid biosynthesis	<i>GNPAT</i>	1		0
fatty acid biosynthesis		0	<i>PTGES3</i>	1
fatty acid metabolism	<i>GNPAT</i>	1		0
female gamete generation	<i>USP9X</i>	1		0
focal adhesion formation	<i>TRIP6</i>	1		0
folic acid and derivative biosynthesis	<i>MTHFD2</i>	1		0
gamma-aminobutyric acid catabolism	<i>ALDH5A1</i>	1		0
gamma-aminobutyric acid metabolism	<i>ALDH5A1</i>	1		0
gluconeogenesis	<i>ATF4</i>	1		0
glucose metabolism		0	<i>H6PD</i>	1
glycogen metabolism	<i>PPP1CB</i>	1		0
glycolysis		0	<i>ENO1</i>	1
heme catabolism	<i>BLVRA</i>	1		0
hemopoiesis	<i>KITLG</i>	1		0
homophilic cell adhesion		0	<i>CDH11</i>	1
immune response	<i>B2M</i> , <i>IFIT5</i> , <i>POMP</i> , <i>CD59</i> , <u><i>C1S</i></u> , <u><i>TBK1</i></u>	6	<u><i>HLA-C</i></u> , <u><i>C4BPA</i></u>	2

				Continuação
immune system process	<i>IFIT5, MITF, B2M, CXCL16, POMP, KITLG, C1S, TBK1, CD59, CD93</i>	10	<i>HLA-C, CD81, C4BPA</i>	3
induction of apoptosis	<i>MAPK1</i>	1		0
induction of positive chemotaxis	<i>VEGFA</i>	1		0
inflammatory response	<i>ANXA1, PLA2G7, <u>C1S</u></i>	3	<i>SERPINA1, C4BPA</i>	2
innate immune response	<i>TBK1, C1S</i>	2	<i>C4BPA, C1R</i>	2
integrin-mediated signaling pathway	<i>CD47</i>	1	<i>ILK</i>	1
intra-Golgi vesicle-mediated transport		0	<i>COPZ1</i>	1
intracellular protein transport	<i>KPNA1</i>	1	<i>KDELRI, COPZ1</i>	2
intracellular signaling cascade	<i>PRKCB1, SH2B3</i>	2		0
ion transport	<i>ATP6V1E1, ITPR1, ATP5E, SLC40A1</i>	4	<i>ATP6V0B</i>	1
iron ion homeostasis	<i>SLC40A1</i>	1	<i>MYC</i>	1
iron ion transport	<i>SLC40A1</i>	1		0
keratinocyte differentiation	<i>ANXA1</i>	1		0
lipid biosynthesis		0	<i>LASS2</i>	1
lipid catabolism	<i>PLA2G7</i>	1		0
lipid metabolism	<i>ANXA1</i>	1	<i>CPNE1</i>	1
lymphocyte chemotaxis	<i>CXCL16</i>	1		0

				Continuação
mRNA catabolism, nonsense-mediated decay		0	<i>EXOSC10</i>	1
mRNA metabolism	<i>PCBP1</i>	1		0
mRNA polyadenylation		0	<i>PABPC1</i>	1
mRNA processing		0	<i>HNRPL</i>	1
mRNA stabilization'		0	<i>PABPC1</i>	1
macrophage activation	<i>CD93</i>	1		0
membrane protein ectodomain proteolysis		0	<i>NCSTN</i>	1
metabolism	<i>BLVRA, SUCLA2, GNPAT, ALDH5A1</i>	4	<i>ARSD, MAN1A1</i>	2
methionyl-tRNA aminoacylation	<i>MARS</i>	1		0
mitochondrial transport	<i>SLC25A27</i>	1	<i>UCP2</i>	1
mitosis		0	<i>TXNL4A</i>	1
morphogenesis	<i>SLC40A1</i>	1		0
muscle contraction	<i>PLN, CALD1</i>	2		0
muscle development	<i>LAMA2, TAGLN</i>	2	<i>TAGLN2, COL6A3</i>	2
negative regulation of anti-apoptosis	<i>RTN4</i>	1		0
negative regulation of apoptosis	<i>VEGFA</i>	2		0
negative regulation of axon extension	<i>RTN4</i>	1		0

				Continuação
negative regulation of caspase activity		0	<i>HSPA5</i>	1
negative regulation of cell adhesion		0	<i>TGFBI</i>	1
negative regulation of cell proliferation	<i>GPNMB, CDKN1B</i>	2		0
negative regulation of gene expression, epigenetic	<i>CREBZF</i>	1		0
negative regulation of transcription	<i>CREBZF, ID1, ID2</i>	3		0
nervous system development	<i>SOD1, VEGFA, DPYSL2, ITM2B</i>	4		0
nitric oxide transport		0	<i>HBB</i>	1
nuclear mRNA splicing, via spliceosome	<i>SFRS7, SFPQ, SF3B14</i>	3	<i>TXNL4A, SF3B3</i>	2
nucleosome assembly	<i>NAP1L1</i>	1		0
nucleotide-excision repair	<i>DDB2</i>	1		0
one-carbon compound metabolism	<i>MTHFD2</i>	1		0
organ morphogenesis	<i>KITLG, GNPAT</i>	2		0
ossification	<i>SPARC</i>	1	<i>CDH11</i>	1
oxygen transport	<i>HBG2</i>	1	<i>HBB</i>	1
pentose-phosphate shunt		0	<i>H6PD</i>	1
peptide cross-linking	<i>ANXA1</i>	1		0
peptidoglycan metabolism		0	<i>MMP3, MMP7, MMP10</i>	3

				Continuação
peroxisome organization and biogenesis	<i>PEX1</i>	1		0
phagocytosis	<i>CD93</i>	1		0
phosphate transport		0	<i>COL1A1, COL6A3</i>	2
phosphatidylinositol biosynthesis		0	<i>CD81</i>	1
phosphoinositide metabolism		0	<i>CD81</i>	1
phospholipase C activation	<i>GNAQ</i>	1		0
positive regulation of B cell proliferation		0	<i>CD81</i>	1
positive regulation of anti-apoptosis	<i>BRE</i>	1		0
positive regulation of cell migration	<i>TRIP6</i>	1		0
positive regulation of cell proliferation	<i>VEGFA, NAP1L1, CDKN1B, S100A6, PPP1CB</i>	5	<i>GRN, MYC, CD81, ILK</i>	4
positive regulation of enzyme activity		0	<i>NCSTN</i>	1
positive regulation of fibroblast proliferation	<i>S100A6</i>	1		0
positive regulation of gluconeogenesis	<i>ARPP-19</i>	1		0
positive regulation of glucose import	<i>ARPP-19</i>	1		0
positive regulation of nitric oxide biosynthesis		0	<i>HBB, HSP90AB1</i>	2
positive regulation of transcription	<i>UBA52</i>	1		0
positive regulation of translation		0	<i>PABPC1</i>	1
postreplication repair	<i>UBE2A</i>	1		0

				Continuação
posttranslational protein folding	<i>UGCGL2</i>	1		0
potassium ion transport	<i>CHP</i>	1		0
prostaglandin biosynthesis		0	<i>PTGES3</i>	1
protein amino acid ADP-ribosylation	<i>GNAQ</i>	1		0
protein amino acid glycosylation	<i>UGCGL2</i>	1	<i>RPN1, MAN1A1</i>	2
protein amino acid phosphorylation	<i>BMPR2, PRKCB1, DAPK1, TBK1, RIPK5, MYLK, MAPK1</i>	7	<i>ILK, MAP3K8</i>	2
protein biosynthesis	<i>EIF3S6, EIF4A2, UBA52, EIF3S3, MARS, SARS, EIF3S12, EIF3S6IP</i>	8	<i>DARS, EEF2, TUFM, EIF3S5, MRPL24</i>	5
protein catabolism	<i>PSMC1</i>	1		0
protein complex assembly		0	<i>DARS, SF3B3</i>	2
protein import into nucleus, translocation		0	<i>CEP57</i>	1
protein kinase C activation	<i>GNB2L1</i>	1		0
protein kinase cascade	<i>DAPK1</i>	1		0
protein localization		0	<i>CD81</i>	1
protein modification	<i>UBA52</i>	1		0
protein processing		0	<i>NCSTN</i>	1
protein repair	<i>MSRB3</i>	1		0
protein retention in ER		0	<i>KDELRI</i>	1

				Continuação
protein transport	<i>PEX1, RAB5A, ATG3</i>	3	<i>KDELRI, LMAN2, VPS11</i>	3
protein ubiquitination	<i>UBA52, ATG3</i>	2		0
proteolysis	<i>CAPN2, C1S, PSMB3, USP9X, UBE2A, UBA52</i>	6	<i>C1R, MMP3, MMP7, MMP10, PRCP, SEC11A, TMPRSS4, PSMB5, NCSTN, RNF11, C4BPA</i>	11
proton transport	<i>ATP6V1E1, ATP5E</i>	2	<i>UCP2, ATP6V0B</i>	2
rRNA processing		0	<i>EXOSC10</i>	1
receptor mediated endocytosis	<i>CXCL16</i>	1		0
regulation of DNA recombination	<i>KPNA1</i>	1		0
regulation of Rho protein signal transduction		0	<i>ARHGEF15</i>	1
regulation of apoptosis	<i>TPT1, RTN4</i>	2		0
regulation of cell adhesion	<i>LAMA2</i>	1	<u><i>TGFBI</i></u>	1
regulation of cell growth	<i>CTGF, MORF4LI</i>	2	<i>IGFBP1, IGFBP2</i>	2
regulation of cell migration	<i>LAMA2</i>	1		0
regulation of cell volume	<i>CLNS1A</i>	1		0
regulation of embryonic development	<i>LAMA2</i>	1		0
regulation of heart contraction	<i>TPM1</i>	1		0
regulation of muscle contraction	<i>TPM1</i>	1		0
regulation of progression through cell cycle	<i>VEGFA, S100A6</i>	2	<i>FOSB</i>	1

				Continuação
regulation of synaptic plasticity	<i>UBA52</i>	1		0
regulation of transcription factor activity'	<i>CREBZF</i>	1		0
regulation of translation	<i>PUM1, PCID1, RSBN1L</i>	3		0
regulation of translational initiation	<i>EIF4A2, EIF3S3</i>	2	<i>HSPB1, EIF3S5</i>	2
response to DNA damage stimulus	<i>BRE</i>	1		0
response to hypoxia	<i>VEGFA</i>	1		0
response to oxidative stress	<i>SOD1</i>	1		0
response to stimulus	<i>RSPO3</i>	1	<i>TGFBI, TIMP3</i>	2
response to stress	<i>MAPK1, ATF4</i>	2		0
response to unfolded protein	<i>DNAJA1, HSPA14</i>	2	<i>HSPB1, HSP90AB1</i>	2
response to virus	<i>CREBZF, TBK1</i>	2		0
response to wounding	<i>CTGF, PLA2G7, GNA13, CIS, ANXA1, CD59, GNAQ</i>	7	<i>SERPINA1, C4BPA</i>	2
sensory perception of sound	<i>ITM2B, MITF</i>	2	<i>COL1A1</i>	1
septin ring assembly	<i>NUBP1</i>	1		0
seryl-tRNA aminoacylation	<i>SARS</i>	1		0
signal peptide processing		0	<i>SEC11A</i>	1
skeletal development	<i>BMPR2, PRELP</i>	2	<i>COL1A1</i>	1

				Continuação
small GTPase mediated signal transduction	<i>RAB5A, CHP</i>	2	<i>RND3, PTPLAD1, RHOC</i>	3
smooth muscle contraction	<i>CNN3</i>	1		0
spliceosome assembly		0	<i>TXNL4A</i>	1
succinyl-CoA metabolism	<i>SUCLA2</i>	1		0
succinyl-CoA pathway	<i>SUCLA2</i>	1		0
superoxide metabolism	<i>SOD1</i>	1		0
synaptic transmission	<i>MAPK1</i>	1		0
tRNA processing	<i>SARS</i>	1		0
telomere maintenance		0	<i>PTGES3</i>	1
tetrahydrofolate metabolism	<i>MTHFD2</i>	1		0
transcription from RNA polymerase II promoter	<i>BTF3, GTF2B, ELP2</i>	3	<i>TSC22D1, POLR2C</i>	2
transcription initiation	<i>GTF2B</i>	1		0
translational elongation		0	<i>TUFM</i>	1
translational initiation	<i>EIF3S12</i>	1		0
tricarboxylic acid cycle	<i>SUCLA2</i>	1		0
tryptophan transport		0	<i>SLC3A2</i>	1
tubulin folding	<i>TCP1</i>	1		0

					Continuação
ubiquitin cycle	<i>UBE2A, Kua-UEV, BRE</i>	3	<i>UBE2W</i>		1
ubiquitin-dependent protein catabolism	<i>USP9X, PSMB3, UBE2A</i>	3	<i>PSMB5</i>		1
vasculogenesis	<i>VEGFA</i>	1			0
vesicle-mediated transport	<i>GOLGA4</i>	1	<i>CPNE1</i>		1
visual perception	<i>CLNS1A, LUM</i>	2	<i>TGFBI, TIMP3</i>		2
epithelial cell differentiation	<i>WT1, VEGFA</i>	2	<i>PAEP</i>		1
epithelial cell proliferation	<i>CDKN1B, VEGFA</i>	2	<i>GRN</i>		1
I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	<i>TBK1</i>	1	<i>PTPLAD1</i>		1
melanocyte differentiation	<i>MITF</i>	1			0
protein folding	<i>PPIC, TCP1, DNAJAI, DNAJC9, DNAJC16, POMP, HSPA14</i>	7	<i>PPIB, HSPB1, PTGES3, HSP90AB1</i>		4
regulation of cell cycle	<i>CDKN1B, S100A6, WT1, VEGFA, BMPR2</i>	5	<i>MYC, FOSB</i>		2
regulation of cell differentiation	<i>MITF, GNAQ</i>	2			0
regulation of epithelial cell proliferation	<i>CDKN1B, VEGFA</i>	2	<i>GRN</i>		1
regulation of growth	<i>UBA52, CTGF, MORF4L1</i>	3	<i>IGFBP1, IGFBP2</i>		2
tissue remodeling	<i>SPARC, CTGF</i>	2	<i>CDH11</i>		1
actomyosin structure organization and biogenesis	<i>CNN3</i>	1			0
adaptive immune response	<i>C1S</i>	1	<i>C4BPA</i>		1
antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I'	<i>B2M</i>	1	<i>HLA-C</i>		1

Continuação

					<i>MITF, BRE, CHP, PRKCB1, S100A6, FMOD, ID1, TRIP6, SFRP4, GNA13, NENF, KITLG, ITPR1, CALM2, DAPK1, TBK1, ANXA1, VEGFA, DPYSL2, ALDH5A1, UBA52, BMPR2, GNB2L1, CD47, SPARC, CTGF, CD59, RAB5A, MAPK1, PPIC, RSPO3, GNAQ</i>		<i>RHOC, IGFBP1, ARHGEF15, PTGES3, MS4A8B, RND3, NCSTN, MYC, ILK, PTPLAD1, HSPA5, CD81, TIMP3, CEP57, GRN, NSMAF, GPR177</i>	
cell communication					<i>WT1, UBA52, CDKN1B, S100A6, MAPK1, PPP1CB, CALM2, ANXA1, VEGFA, BMPR2,</i>	32		17
cell cycle					<i>CDKN1B, S100A6, WT1, VEGFA, BMPR2, PPP1CB</i>	10	<i>TXNL4A, SPECC1L, PSMD13, MYC, FOSB</i>	5
cell cycle process					<i>MITF, BRE, CFDP1, ITM2B, DAPK1, ANXA1, RTN4, VEGFA, TPT1, TSC22D3, MAPK1</i>	6	<i>TXNL4A, PSMD13, MYC, FOSB</i>	4
cell death					<i>SFRP4, MITF, BRE, S100A6, CLN5, WT1, CFDP1, GNA13, ITM2B, DAPK1, ANXA1, RTN4, VEGFA, TPT1, UBA52, CTGF, TSC22D3, MAPK1, GNAQ</i>	11	<i>DAP, MYC, HSPA5, HSPB1</i>	4
cell differentiation					<i>S100A6, CFDP1, GNA13, RTN4, VEGFA, UBA52, CTGF, MORF4L1</i>	19	<i>DAP, MYC, HSPA5, HSPB1, PAEP</i>	5
cell morphogenesis						8	<i>IGFBP1, IGFBP2, SLC3A2, ILK</i>	4
cell surface receptor linked signal transduction					<i>ANXA1, CD59</i>	2		0
cell-substrate adhesion					<i>TRIP6, CD47, CTGF</i>	3	<i>ILK</i>	1
chemical homeostasis					<i>PRKCB1, SLC40A1, CLN5, TPT1, PLN</i>	5	<i>MYC</i>	1
death					<i>MITF, BRE, CFDP1, ITM2B, DAPK1, ANXA1, RTN4, VEGFA, TPT1, TSC22D3, MAPK1</i>	11	<i>DAP, MYC, HSPA5, HSPB1</i>	4
defense response					<i>PLA2G7, C1S, TBK1, ANXA1, CD59</i>	5	<i>SERPINA1, C4BPA</i>	2
double-strand break repair via nonhomologous end joining						0	<i>XRCC6</i>	1

				Continuação
electron transport	<i>BLVRA, UQCRRF1, PCMI, RSPO3, ALDH5A1</i>	5		0
embryonic development	<i>VEZT, GNA13, VEGFA, BMPR2, LAMA2, GNAQ</i>	6	<i>GRN</i>	1
fibroblast growth factor receptor signaling pathway		0	<i>CEP57</i>	1
generation of precursor metabolites and energy	<i>SLC25A27</i>	1		0
G-protein coupled receptor protein signaling pathway	<i>CALM2, GNAQ, GNA13, C1S</i>	4		0
induction of apoptosis by extracellular signals	<i>DAPK1</i>	1	<i>TIMP3, DAP</i>	2
long-term strengthening of neuromuscular junction	<i>UBA52</i>	1		0
negative regulation of progression through cell cycle	<i>WT1</i>	1		0
negative regulation of transcription factor activity	<i>ID1, ID2</i>	2		0
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	<i>MEIS2</i>	1	<i>FOSB</i>	1
nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	<i>DPYSL2, AK3</i>	2		0
positive regulation of 1-phosphatidylinositol 4-kinase activity		0	<i>CD81</i>	1
positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	<i>TBK1</i>	1	<i>GPR177, RHOC</i>	2
positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation		0	<i>CD81</i>	1
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	<i>ATF4</i>	1		0
positive regulation of transcription, DNA-dependent		0	<i>XRCC6</i>	1

				Continuação
positive regulation of vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway	<i>VEGFA</i>	1		0
	<i>MITF, BRE, CFDP1, ITM2B, DAPK1, ANXA1, RTN4, VEGFA, TPT1, TSC22D3, MAPK1</i>	11	<i>DAP, MYC, HSPA5, HSPB1</i>	4
programmed cell death				
protein amino acid N-linked glycosylation via asparagine		0	<i>RPN1</i>	1
protein ubiquitination during ubiquitin-dependent protein catabolism		0	<i>RNF11</i>	1
	<i>MITF, CDKN1B, S100A6, CFDP1, ANXA1, VEGFA, GPNMB, BMPR2, PPP1CB, NAP1L1</i>	10	<i>MYC, ILK, CD81, GRN</i>	4
regulation of cell proliferation				
regulation of cyclin-dependent protein kinase activity	<i>CDKN1B</i>	1		0
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	<i>ID1, TCF4</i>	2	<i>MYC</i>	1
	<i>WT1, LMO3, TSC22D3, PQBP1, BTF3, CREBZF, GTF2B, MEIS2, SFPQ, BAZ1A, ANKHD1, ZMIZ1, ZNF227, ATF4, MITF, MORF4L1</i>	16	<i>ENO1, MYC, TSC22D1, FOSB, LASS2, AKNA</i>	6
regulation of transcription, DNA-dependent release of cytoplasmic sequestered NF-kappaB	<i>TRIP6</i>	1		0
retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER		0	<i>COPZ1</i>	1
	<i>PPIC, VEGFA, DPYSL2, GNAQ, ITPRI, KITLG, DAPK1, GNB2L1, GNA13, S100A6, MAPK1</i>	11	<i>IGFBP1, GRN, NSMAF, PTGES3, MS4A8B</i>	5
signal transduction	<i>WT1, LMO3, PQBP1, BTF3, CREBZF, POLR2G, SFPQ, PCM1, BAZ1A, POLR1D, ANKHD1, ZMIZ1, ZNF227, ATF4, MORF4L1</i>	15	<i>ENO1, TSC22D1, POLR2C</i>	3
Transcription				
transforming growth factor beta receptor complex assembly	<i>FMOD</i>	1		0
transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	<i>BMPR2</i>	1		0

				Continuação
transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	<i>SPARC</i>	1	<i>TIMP3</i>	1
Transport	<i>HBG2, CLNS1A, SLC25A27, UQCRRF1, ABCA8, SYT11</i>	6	<i>HBB, PAEP, UCP2, LAPTM4A</i>	4
tricarboxylic acid cycle intermediate metabolism	<i>LDHB</i>	1	<i>LDHA</i>	1
virion attachment, binding of host cell surface receptor		0	<i>CD81</i>	1
sem função conhecida	<i>MGC52110, TMEM44, CCDC66, CCDC90A, MGC12966, PRCC, SSU72, C11orf58, C3orf28, KIAA0831, FAM19A5, FAM35A, TMEM168, RPIB9, C10orf104, CCDC80, XIST</i>	17	<i>FAM134B, C22orf28, RMND5B, UBAC2, LOC643433, LOC653352</i>	6

MANUSCRITO

SUBMETIDO PARA A FERTILITY AND STERILITY (FNS-S-07-0173)

Elsevier Editorial System(tm) for Fertility and Sterility
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Glycodelin expression in normal endometrium without endometriosis, and in eutopic and ectopic tissue of women with endometriosis.

Article Type: Reproductive Biology

Section/Category:

Keywords: endometriosis; endometrium; gene expression; glycodelin

Corresponding Author: Prof Juliana Meola,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Juliana Meola, M.Sc.

Order of Authors: Juliana Meola, M.Sc.; Daniel B Dentillo, Ph.D.; Júlio C Rosa e Silva, M.D., PhD.; Rui A Ferriani, M.D., PhD.; Luciana C Veiga, M.Sc.; Cláudia C Paro de Paz, PhD.; Silvana Giuliatti, PhD.; Lúcia Martelli, M.D., PhD.

Abstract: Objective: To better understand the molecular environment of endometriotic lesions, and to elucidate potential mechanisms that underlie the complex physiopathology of endometriosis, we analyzed the expression of the glycodelin gene.

Design: Prospective laboratory study.

Setting: University hospital.

Patients: Eleven healthy fertile women and seventeen patients with endometriosis diagnosis in early proliferative phase of the menstrual cycle.

Intervention(s): Endometrial biopsy specimens were obtained from normal endometrium of healthy women without endometriosis, and from eutopic and ectopic endometrium tissues (pelvic and ovarian endometriotic implants) of endometriosis patients.

Main Outcome Measure(s): The glycodelin relative expression level by real time PCR analysis.

Result(s): Glycodelin down-regulation was found in the endometriotic lesions, 332.26 and 123.17-fold lower, respectively, when compared to the eutopic tissue ($P<0.05$) and the normal endometrium ($P<0.0001$).

Conclusion: According to these findings, we believe that glycodelin may be one of the molecules responsible for loss of cellular homeostasis in endometriotic lesions.

Suggested Reviewers: Robert W Rebar M.D.

rrebar@asrm.org

David L Keefe

dkeefe@hsc.usf.edu

Carlos A Petta

cpetta@attglobal.net

Opposed Reviewers:

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

TITLE PAGE

Title: Glycodelin expression in normal endometrium without endometriosis, and in eutopic and ectopic tissue of women with endometriosis.

Authors: Juliana Meola, M.Sc.^a
Daniel Blassioli Dentillo, Ph.D.^a,
Júlio César Rosa e Silva, M.D., PhD.^b,
Rui Alberto Ferriani, M.D., PhD.^b
Luciana Caricati Veiga, M.Sc.^a
Cláudia Cristina Paro de Paz, Ph.D.^{a,c}
Silvana Giuliatti, Ph.D.^a
Lúcia Martelli, M.D., PhD.^a

This study was performed in the Laboratory of Molecular Genetics and Human Molecular Cytogenetics, Department of Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto (FMRP-USP), Brazil.

Department affiliations:

^a Department of Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 14049-900, Brazil.

^b Department of Gynecology and Obstetrics, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 14049-900, Brazil.

^c APTA - Department of Agriculture - São Paulo State Government, Ribeirão Preto, 14030-670, Brazil.

Financial support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROEX), Brasília, Distrito Federal, Brazil; and Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA/HCFMRP-USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

CAPSULE

Glycodelin down-regulation in endometriotic lesions compared to eutopic endometrium of endometriosis patients and normal endometrium of women without endometriosis probably indicates alteration in the normal cell differentiation, proliferation and apoptosis.

STRUCTURED ABSTRACT AND KEY WORDS

ABSTRACT

Objective: To better understand the molecular environment of endometriotic lesions, and to elucidate potential mechanisms that underlie the complex physiopathology of endometriosis, we analyzed the expression of the glycodeilin gene.

Design: Prospective laboratory study.

Setting: University hospital.

Patients: Eleven healthy fertile women and seventeen patients with endometriosis diagnosis in early proliferative phase of the menstrual cycle.

Intervention(s): Endometrial biopsy specimens were obtained from normal endometrium of healthy women without endometriosis, and from eutopic and ectopic endometrium tissues (pelvic and ovarian endometriotic implants) of endometriosis patients.

Main Outcome Measure(s): The glycodeilin relative expression level by real time PCR analysis.

Result(s): Glycodeilin down-regulation was found in the endometriotic lesions, 332.26 and 123.17-fold lower, respectively, when compared to the eutopic tissue ($P<0.05$) and the normal endometrium ($P<0.0001$).

Conclusion: According to these findings, we believe that glycodeilin may be one of the molecules responsible for loss of cellular homeostasis in endometriotic lesions.

KEY WORDS: endometriosis, endometrium, gene expression, glycodeilin.

INTRODUCTION

Endometriosis is an estrogen-dependent, very aggressive, common benign gynecological disease, that affects at least 10% of women in reproductive age (1). It is characterized by the growth of glands and endometrial stroma outside the uterine cavity, known as ectopic tissue (2). Histologically, it is identical to the normal endometrium (eutopic) but it is biochemically and functionally different in a number of pathways including the receptivity to steroids and the invasive potential (3). The most common implantation site is the peritoneum but, occasionally, lesions were detected in the pleural cavity, liver, kidney, bladder and rarely, in men (4). It is characterized by symptoms such as dysmenorrhea, dyspareunia, dysuria and pelvic pain (5). Around 30 to 50% of infertile patients present the disease (6); however, many women with endometriotic implants can be asymptomatic (7).

The etiology of endometriosis is complex and multifactorial. The implantation theory of Sampson, although controversial, is the most widely accepted (8). This theory is supported by the occurrence of retrograde menstrual flow in 90% of women (9) and viable endometrial epithelial cells in the peritoneal fluid (10), that is, endometrial cells presenting adhesion, implantation, growth, and angiogenesis characteristics (11) and an immune surveillance escape mechanism (4). Moreover, 1% of the endometriosis cases are related to cancer (12), and the disease has shown polygenic tendencies due to a higher risk of 5 to 8% of occurrence in women with a family history of endometriosis in first degree relatives (13).

Gene expression changes at specific moments are determinant in normal and abnormal physiological processes. The explanation of mechanisms which support the complex physiopathology of endometriosis, in order to clarify the expression and function of correlated genes, allows the elucidation of the molecular environment of

endometriotic lesions. Some studies have associated glycodeilin expression and its functions to malignant and benign gynecological diseases such as endometriosis (14).

Glycodeilin is a glycoprotein from the human lipocalins superfamily and is mainly expressed in reproductive tissues (15). This protein contains a number of glycosylation sites and many isoforms have already been described (15), glycodeilin A being the one found in the amniotic fluid (16), endometrium and decidua (17). The *PAEP* (progestagen-associated endometrial protein) gene, official symbol for the glycodeilin gene, is located in the chromosomal region 9q34 (18), composed by 7 exons and has four response putative elements for glucocorticoids/progesterone upstream from its promoter region. Therefore, the glycodeilin synthesis seems to be regulated by progesterone (19).

Gene expression in the normal endometrial tissue is regulated during the menstrual cycle phases, being down-regulated in the proliferative phase, up-regulated initially and down-regulated at the end of the secretory phase (20). This means that it is abundant during the implantation window in normal cycles compared to infertile women's cycles (21) and rare in the periovulatory period, when fertilization may occur (22, 23). It is also widely expressed at the beginning of pregnancy involving embryo protection in the maternal-fetal interface (24). Glycodeilin also inhibits the sperm-oocyte connection because it binds to the sperm head (25).

Although the precise function of glycodeilin is still unknown, it is believed that its activity could depend on the type of glycosilation undergone. Some of the proposed functions are: immunosuppression (26), contraception (25), participation in angiogenesis (27, 28), and apoptosis (29, 30). Moreover, there are also activities independent from glycosilation such as glandular morphogenesis induction, epithelial differentiation and tumor suppression (31, 32).

The purpose of our study was to compare the *PAEP* gene expression levels in normal endometrial tissue from women without endometriosis and in the eutopic and ectopic endometrium (pelvic and ovarian endometriotic implants) from endometriosis patients.

MATERIAL AND METHODS

This study was realized in the Laboratory of Molecular Genetics and Human Molecular Cytogenetics, Department of Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto (FMRP-USP), Brazil. The project was approved by the Research Ethics Committee (CEP) of the University Hospital from the FMRP-USP (# 11736/2004). Written informed consent was obtained from each patient.

Samples

Twenty-eight patients were selected using the following inclusion criteria: reproductive age (18 to 40 years); early proliferative phase of the menstrual cycle (days 5-8); with regular cycles and no history of any hormonal therapy during the last six months before the biopsies. The endometriosis stage was settled in agreement with the American Society for Reproductive Medicine classification (33).

The patients were divided into two groups: (A) the control group, where normal endometrial biopsies were collected using a Novak curette from 11 women with no diagnosis of endometriosis nor infertility, referred to our service by the Family Planning Ambulatory with tubal ligation indication; (B) 17 patients with endometriosis diagnosis, referred to our service by the Endoscopy and Pelvic Pain Ambulatory and Infertility Ambulatory of the University Hospital due to pelvic pain and/or infertility indication. Biopsies of eutopic (n=17) and ectopic (n=17) endometrium of the same patients were collected by laparoscopy. Among the 17 ectopic endometrium biopsies, 8 were stage II (4), III (2) and IV (2) peritoneal lesions, and 9 were stage III (2) and IV

(7) ovarian lesions. The diagnosis was confirmed through histopathological analysis. The samples were stored at -80°C after cryopreservation treatment with Tissue-Teck[®] O.C.T. Compound (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA).

RNA extraction

The samples were washed in PBS (1x) (NaCl 8.50g/L; Na_2HPO_4 1.11g/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.81g/L; KH_2PO_4 0.20g/L pH7.0) to remove the cryoprotector from the tissues. Then, the total RNA was extracted (50mg of tissue) using TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK.) according to the manufacturer's instructions. The RNA integrity was analyzed by electrophoresis. The total RNA concentrations were obtained using a spectrophotometer at an optical density of 260nm. The RNA was stored at -80°C for future procedures.

cDNA synthesis

One microgram of total RNA from each sample was reversely transcribed using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) according to the manufacturer's instructions.

Quantitative Real Time – PCR (Q RT-PCR)

From all 45 collected samples, 44 (10 normal endometrium tissues, 17 eutopic and 17 ectopic tissues) were submitted to real time PCR analysis in the ABI PRISM[™] 7500 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Warrington, UK) for relative quantification of the glycodeilin gene expression. One of the normal endometrium samples was randomly chosen to be used as calibrator. The reactions were performed using the TaqMan[®] Gene Expression Assays system (TaqMan[®] MGB probes, FAM[™] dye-labeled) from Applied Biosystems. The probes and the primers for the *PAEP* (Hs01046125_m1) and *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, endogenous control) (Hs99999905_m1) genes were obtained using the Assay-on-

Demand™ Gene Expression Products (Applied Biosystems, Warrington, UK). In order to verify the efficiency of the probes and primers in the amplification reaction for the genes *PAEP* and *GAPDH*, calibration curves were built in threefold from serial dilutions (non-diluted, 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}) of the cDNA obtained from a pool of equal amounts of all samples. Using the calibration curve, the standard-curve was built. The standard-curves with slope between -3.6 and -3.1 were considered.

A Q RT-PCR was performed in double for each sample according to the following conditions: 10µL of TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems, Warrington, UK), 1µL of TaqMan® Gene Expression Assay Mix (20X) (Applied Biosystems, Warrington, UK) and 9µL of diluted cDNA (1/50 dilution) in a final volume of 20µL for each reaction. The reaction conditions were 50°C for 2 minutes, then 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The glycodeilin expression level was calculated for each sample according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method as previously described in the Applied Biosystems User Bulletin # 2 (PN 4303859) (Applied Biosystems, Warrington, UK) and according to the literature (34, 35). The *GAPDH* (endogenous) and the calibrator sample were used as normalizers for the $2^{-\Delta\Delta CT}$ calculus.

Statistical analysis

The glycodeilin gene expression variable was transformed by $\log_{10}$. The logarithmic transformation was necessary because one of the suppositions (linearity) made in the linear models analyses was not answered. These analyses specify that the conditional average $E(y | x = x_0)$ from the response variable y given the x_0 value of the predictor vector x , is linear in x_0 . The application of the linear models can be extended supposing that an appropriated transformation of the answer variable given by $t(y)$,

where $E\{t(y)|x\}$, be linear in x , in the function $t(y) = \beta_0 + \beta^T x + \varepsilon$, for unknown β_0 e β^T . The term ε (random error) is independent from x and has an average of zero (36).

The statistical analyses were carried out using the statistical software package SAS 2003 (2002-2003, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The Dunnetts test was used according to the GLM procedures to compare the mean value of $2^{-\Delta\Delta CT}$ for the *PAEP* expression obtained from (1) normal endometrium and ectopic tissue, (2) normal endometrium and eutopic tissue, (3) peritoneal and ovarian lesions. To compare the average glycodeilin expression in the eutopic and ectopic tissues, the paired T test was used. Correlation analyses were performed by the PROC CORR among the *PAEP* expression levels obtained in the ectopic tissues and the lesions staging. Analyses with $P < 0.05$ were considered to be statistically significant. The mean value of $2^{-\Delta\Delta CT}$ was used to calculate the mean fold-change of gene expression in each group.

RESULTS

The relative quantification for the glycodeilin gene expression in the different tissues is represented in Figure 1. We have observed a significant difference in expression between the ectopic and the eutopic endometrium of patients with endometriosis ($P < 0.05$), and between the ectopic endometrium tissues of patients with endometriosis and controls (normal endometrium, $P < 0.0001$). On average, the glycoprotein expression was approximately 332-fold down-regulated in the endometriotic lesions in relation to the average expression observed in the eutopic tissues and 123-fold down-regulated in relation to the average expression observed in the normal endometrium. However, we have not observed any significant difference in expression between the eutopic endometrium tissues of women with endometriosis and normal endometrium of the control group.

When the results of the *PAEP* gene relative quantifications were compared in the different types of lesion sites, ovarian or peritoneal, no significant difference in glycodeilin expression at the different locations was observed. Although there are no significant differences, the values of glycodeilin expression in the peritoneal and ovarian tissues are represented in Figure 2. Moreover, no significant correlation between the glycodeilin expression levels from ectopic endometrium tissues and the disease staging was observed.

DISCUSSION

We believe that comparative studies of gene expression between ectopic and eutopic endometrial cells can elucidate the mechanisms involved in the complex and multifactorial development of endometriosis. As previously described, these tissues are biochemically and functionally different in a number of pathways including the receptivity to steroids and the invasive potential (3). Moreover, according to the most acceptable etiological theory for endometriosis, the cells present in the menstrual reflow are in the early proliferative phase of the cycle, which is an important phase for the alterations analyzes in endometrial cell gene expression.

Additionally, in a previous report from our group (unpublished observations), we analyzed the expression profiling of endometrium from women with endometriosis using subtractive hybridization in the early proliferative phase of the menstrual cycle. Data indicated glycodeilin as one of the differentially expressed genes in the ectopic endometrium when compared to the eutopic one.

The endometrium is the only adult tissue able to undergo intense proliferation, secretion, regression and regeneration during each menstrual cycle, and such cyclic alterations are rigorously regulated by hormones and gene expression variations (37). Cellular differentiation is an intrinsic characteristic of this process and some studies

have suggested that glycodelin has important functions in epithelial cell differentiation. Glycodelin cDNA transfection studies in MCF-7 breast cancer cells (38) and in endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa cells) (31, 32) have showed that simultaneously to glycodelin expression induction, malignant cells have been converted to a normal phenotype presenting less proliferation and apoptosis induction. Furthermore, there was an up-regulation expression of markers of organized epithelia, such as cytokeratins 8 and 18 as well as E-cadherin, and down-regulation of *vimentin*, *MUC1* and *Bcl-X_L* genes, associated to tumor development and chemoresistance induction. Therefore, it has been suggested that glycodelin has a tumor suppressor function and its synthesis-stimulating pathways should be reevaluated, for future applications in supporting chemotherapy of malignant tumors (32). It has also been showed that histone deacetylase inhibitors suppress the endometrium and endometriotic cells proliferation (39), and these inhibitors are able to directly stimulate glycodelin up-regulation in malignant cells inducing the differentiation to normal features (40).

In this study, glycodelin down-regulation in endometriotic lesions compared to eutopic endometrium of endometriosis patients and normal endometrium of women without endometriosis probably indicates an alteration in the normal cell differentiation, proliferation control and apoptosis induction, i.e., cellular homeostasis alteration associated to loss of the glycodelin functions. It is possible that such loss of function is a result of genomic alterations in the endometriotic lesions because loss at the 9q34 chromosome region, where the *PAEP* gene is located, was found in ectopic endometrium tissue (41).

Kao *et al.* (21) found a lower glycodelin expression in the secretory phase of the menstrual cycle using microarray analyses and northern blot validation in eutopic tissue of patients with endometriosis when compared to normal endometrium of women

without endometriosis. We believe that these discordant data are primarily due to the different cycle phases analyzed. Also, it is possible that the differences could be due to the different applied methodologies. The quantification using real time PCR is considered the gold standard methodology for gene expression quantification because it can measure very large and very small amounts of transcripts, with high sensitivity and specificity when compared to other techniques such as northern blot (42). Although we have not detected significant differences in glycodeilin gene expression among these tissues, a higher expression was observed in the eutopic tissue than in the normal endometrium. This finding corroborates the idea that glycodeilin performs functions in cell homeostasis maintenance. A larger number of samples are necessary to confirm this hypothesis.

Studies with anti-glycodeilin antibodies have showed that glycodeilin expression was more frequent in well-differentiated ovarian serous carcinomas when compared to poorly differentiated, and the expression of this glycoprotein was also more frequent in early stages when compared to advanced tumoral stages. Moreover, glycodeilin expression was associated with better prognosis (43). Although a higher glycodeilin expression has been observed in the peritoneal lesions when compared to the ovarian ones, this difference was not significant. A higher expression was expected in the peritoneal lesions, where the early stages of endometriosis were predominant, than in the ovarian lesions.

According to these considerations, we believe that glycodeilin may be one of the molecules responsible for cellular homeostasis loss in endometriotic lesions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the patients for their participation in this study; to the multidisciplinary teamworking from the Human Reproduction Division of the

Department of Gynecology and Obstetrics, FMRP – USP for the sample collection; to the technical support of the Pediatrics Oncology Laboratory of the Department of Pediatrics and Puericulture, FMRP-USP.

REFERENCES

1. Yang W-CV, Chen H-W, Au H-K, Chang C-W, Huang C-T, Yen Y-H Tzeng C-R. Serum and endometrial markers. *Best Pratic. Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18:177-200.
2. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to mestrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14:422-9.
3. Gaetje R, Kotzian S, Hermann G, Baumann R, Starzinski-Powitz A. Invasiveness of endometriotic cells in vitro. *Lancet* 1995; 346:1463-64.
4. Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil. Steril* 2001; 75:1-9.
5. Poliness AE, Healey MG, Brennecke SP, Moses EK. Proteomic approaches in endometriosis research. *Proteomics* 2004; 4:1897-1902.
6. Birmingham A. Endometriosis and infertility. *Fertil Steril* 2006; 86:156-60.
7. Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Evers JLH, Dunselman GAJ. Pathogenesis of endometriosis. *Best Pratic Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18:233-44.
8. Redwine D. Mülleriosis: the single best-fit model of the origin of endometriosis. *J Reprod Med* 1988; 33:915-20.
9. Halme J, Hammond M, Hulka J, Raj S, Talbert L. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 64:151-54.
10. Kruitwagen RF, Poels LG, Willemsen WN, DeRonge IJ, Jap PH, Rolland R. Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertil Steril* 1991; 55:297-303.
11. Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pratic Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18:177-200.

12. La Grenade A, Silverberg SG. Ovarian tumors associated with atypical endometriosis. *Human Pathol* 1988; 19:1080-84.
13. Bischoff F, Simpson JL. Genetics of endometriosis: heritability and candidate genes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18:219-32.
14. Horowitz IR, Cho C, Song M, Flowers LC, Santanam N, Parthasarathy S, *et al.* Increased glycodelin levels in gynecological malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11:173–79.
15. Seppälä M, Taylor RN, Koistinen H, Koistinen R, Milgrom E. Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr Rev* 2002; 23:401-30.
16. Riittinen L, Julkunen M, Seppala M, Koistinen R, Huhtala ML. Purification and characterization of endometrial protein PP14 from mid-trimester amniotic fluid. *Clin Chim Acta* 1989; 184:19–29.
17. Julkunen M, Koistinen R, Sjoberg J, Rutanen EM, Wahlstrom T, Seppälä M. Secretory endometrium synthesizes placental protein 14. *Endocrinology* 1986; 118:1782–86.
18. Van Cong N, Vaisse C, Gross MS, Slim R, Milgrom E, Bernheim A. The human placental protein 14 (PP14) gene is localized on chromosome 9q34. *Hum Genet* 1991; 86:515–18.
19. Vaisse C, Atger M, Potier B, Milgrom E. Human placental protein 14 gene: sequence and characterization of a short duplication. *DNA Cell Biol* 1990; 9:401-13.
20. Mylonas I, Jeschke U, Kunert-Keil C, Shabani N, Dian D, Bauerfeind I, *et al.* Glycodelin A is expressed differentially in normal human endometrial tissue

- throughout the menstrual cycle as assessed by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Fertil Steril* 2006; 86:1488-97.
21. 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* 2003; 144:2870-81.
22. Li TC, Ling E, Dalton C, Bolton AE, Cooke ID. Concentration of endometrial protein PP14 in uterine flushings throughout the menstrual cycle in normal, fertile women. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; 100:460-64.
23. Seppälä M, Koistinen H, Koistinen R, Chiu PCN, Yeung WSB. Glycosylation related actions of glycodelin: gamete, cumulus cell, immune cell and clinical associations. *Hum Reprod Update* 2007; 13:275-87.
24. Clark GF, Oehninger S, Patankar MS, Koistinen R, Dell A, Morris HR, *et al.* A role for glycoconjugates in human development: the human feto-embryonic defence system hypothesis. *Hum Reprod* 1996; 11:467-73.
25. Oehninger S, Coddington CC, Hodgen GD, Seppälä M. Factors affecting fertilization: endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Fertil Steril* 1995; 63:377-83.
26. Rachmilewitz J, Borovsky Z, Riely GJ, Miller R, Tykocinski ML. Negative regulation of T cell activation by placental protein 14 is mediated by the tyrosine phosphatase receptor CD45. *J Biol Chem* 2003; 278:14059–65.
27. Song M, Ramaswamy S, Ramachandran S, Flowers LC, Horowitz IR, Rock JA, *et al.* Angiogenic role for glycodelin in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:9265-70.

28. Park JK, Song M, Dominguez CE, Walter MF, Santanam N, Parthasarathy S, *et al.* Glycodelin mediates the increase in vascular endothelial growth factor in response to oxidative stress in the endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195:1772-77.
29. Mukhopadhyay D, SundarRaj S, Alok A, Karande AA. Glycodelin A, not glycodelin S, is apoptotically active. Relevance of sialic acid modification. *J Biol Chem* 2004; 279:8577-84.
30. Jayachandran R, Radcliffe CM, Royle L, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM, *et al.* Oligosaccharides modulate the apoptotic activity of glycodelin. *Glycobiology* 2006; 16:1052-63.
31. Arnold JT, Lessey BA, Seppälä M, Kaufman DG. Effect of Normal Endometrial Stroma on Growth and Differentiation in Ishikawa Endometrial Adenocarcinoma Cells. *Cancer Res* 2002; 62:79-88.
32. Koistinen H, Seppälä M, Nagy B, Tapper J, Knuutila S, Koistinen R. Glycodelin reduces carcinoma-associated gene expression in endometrial adenocarcinoma cells. *Am J Obst Gynecol* 2005; 193:1955-60.
33. American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997; 67:817-21.
34. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 2000; 285:194-204.
35. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001; 25:402-8.
36. Cook RD, Weisberg S. Transforming a response variable for linearity. *Biometrika* 1994; 81:731-7.

37. Esfandiari N, Ai J, Nazemian Z, Javed MH, Gotlieb L, Casper RF. Expression of Glycodelin and Cyclooxygenase-2 in Human Endometrial Tissue Following Three-dimensional Culture. *Am J Reprod Immunol* 2007; 57:49–54.
38. Kämäräinen M, Seppälä M, Virtanen I, Andersson LC. Expression of glycodelin in MCF-7 breast cancer cells induces epithelial differentiation into organized acinar epithelium. *Lab Invest* 1997; 77:565-73.
39. Wu Y, Guo SW. Inhibition of proliferation of endometrial stromal cells by trichostatin A, RU486, CDB-2914, N-acetylcysteine, and ICI 182780. *Gynecol Obstet Invest* 2006; 62:193-205.
40. Uchida H, Maruyama T, Nagashima T, Asada H, Yoshimura Y. Histone Deacetylase Inhibitors Induce Differentiation of Human Endometrial Adenocarcinoma Cells through Up-Regulation of Glycodelin. *Endocrinology* 2005; 146:5365-73.
41. 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. *Hum Genet* 1999; 105:444-51.
42. 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. *Pharm Res* 2003; 20:1373-80.
43. Mandelin E, Lassus H, Seppälä M, Leminen A, Gustafsson J-A, Cheng G, *et al.* Glycodelin in Ovarian Serous Carcinoma: Association with Differentiation and Survival. *Cancer Res* 2003; 63:6258-64.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Glycodelin gene expression quantification obtained by real time PCR in normal endometrium (NE, n=10, mean=0.936) from patients without endometriosis, and eutopic (EU, n=17, mean=2.525) and ectopic (EC, n=17, mean=0.007) endometrium tissue from endometriosis patients. The vertical and horizontal axes represent, respectively, the mean value of $2^{-\Delta\Delta CT}$ for glycodelin in different groups and the different tissues analyzed.

Figure 2: Glycodelin gene expression quantification obtained by real time PCR in eight peritoneal (P, mean=0.014) and nine ovarian (O, mean=0.001) lesions. The vertical and horizontal axes represent, respectively, the mean value of $2^{-\Delta\Delta CT}$ for glycodelin in different lesions and the different lesion sites.