**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

CARLOS VALÉRIO DA ROCHA JUNIOR

**PADRÃO DE METILAÇÃO DO RECEPTOR DE
PROGESTERONA (*PGR*) EM ENDOMÉTRIO EUTÓPICO
DE PACIENTES COM INFERTILIDADE RELACIONADA
À ENDOMETRIOSE DURANTE A FASE SECRETORA**

**RIBEIRÃO PRETO
2015**

CARLOS VALÉRIO DA ROCHA JUNIOR

**Padrão de metilação do receptor de progesterona (*PGR*) em
endométrio eutópico de pacientes com infertilidade relacionada à
endometriose durante a fase secretora**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do
Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e
Obstetrícia

Orientador: Professor Doutor Rui Alberto
Ferriani

**RIBEIRÃO PRETO
2015**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha Junior, Carlos Valério da

Padrão de metilação do receptor de progesterona (PGR) em endométrio eutópico de pacientes com infertilidade relacionada à endometriose durante a fase secretora

77 p. il: 30cm.

Dissertação para título de Mestre apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientador: Rui Alberto Ferriani

1. Endometriose. 2. Infertilidade 3. PGR. 4. PR-B. 5. Metilação. 6. Fase Secretora.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Padrão de metilação do receptor de progesterona (*PGR*) em endométrio eutópico de pacientes com infertilidade relacionada à endometriose durante a fase secretora

Dissertação apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador: Professor Doutor Rui Alberto Ferriani

Banca examinadora:

Dr. Lisandra Cristina Caetano da Silva

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura:.....

Prof. Dr. Rosana M. dos Reis

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura:.....

Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura:.....

Dedicatória

Aos meus pais, *Carlos e Marlene*, que sempre acreditaram e investiram no poder da educação e em minha capacidade.

À minha irmã *Carla* e meu cunhado *David* pelo apoio.

À *Mateus Anacleto* pela cumplicidade e incentivo.

Agradecimentos

Á Deus por ter me trazido ate este lugar e pelas pessoas que encontrei.

Ao Prof.º Dr. Rui Alberto Ferriani pela orientação e confiança para a execução deste trabalho. Exemplo de profissional e pessoa que levarei sempre comigo.

Á Dr.^a. Paula Andrea de Albuquerque Sales Navarro pelo aconselhamento durante todas as etapas e pela amizade.

Á Dr.^a Cristiana Libardi por toda a atenção e ensinamentos que tornaram possível a conclusão deste projeto.

Á M.^a. Michele Gomes da Broi pela presença em todos os estágios deste trabalho e da minha vida nos últimos anos. Sua amizade e companheirismo foram fundamentais para a realização de tudo.

Á Dr.^a Juliana Meola pela receptividade, aconselhamento e ensinamentos.

Ao Dr. Welington de Paula Martins, Dr^a Stael Porto Leite e aos médicos residentes do departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP pelo pronto auxilio.

À Cristiana Padovan e Lilian Costa pela amizade e profissionalismo.

À todas as enfermeiras e funcionário do departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP, especialmente à Océlia de Vasconcelos e Mariza.

Agradeço também a todos os amigos pós-graduandos do departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP pelo companheirismo, especialmente à Valéria Aguiar, Vanessa Giorgi, Daiane Bulgarelli e Bruna Gazeto.

Aos funcionários do departamento de Genética do Hemocentro de Ribeirão Preto, especialmente ao Prof. Dr. Wilson á Greice.

Às secretárias Ilza e Suelen, pelo auxilio e paciência.

Epígrafe

“Se vai tentar, vá até o fim.

Não há outra emoção como essa.

Você estará sozinho com os deuses e as noites queimarão como fogo.

Faça, faça, faça. faça,

até o fim, até o fim.

Você cavalgará a vida diretamente para o riso perfeito.

Essa é a única boa luta que existe.”

Charles Bukowski

Resumo

ROCHA JUNIOR, CV. **Padrão de metilação do receptor de progesterona (*PGR*) em endométrio eutópico de pacientes com infertilidade relacionada à endometriose durante a fase secretora** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A endometriose é uma doença caracterizada pelo crescimento de tecido endometrial ectópico histologicamente similar ao do endométrio eutópico. Dentre sua sintomatologia, encontra-se relatos de infertilidade a qual está relacionada à diminuição da receptividade endometrial e a resistência à progesterona, importante hormônio envolvido no estabelecimento desse processo e na manutenção da gestação. A etiologia da endometriose não é bem conhecida, mas estudos sugerem que essa desordem possa estar ligada a mecanismos epigenéticos de regulação da expressão genica, tais como a metilação do DNA. A receptividade endometrial à progesterona é mediada por receptores (PR-A e PR-B) a qual parece estar suprimida nessas pacientes, possivelmente por diminuição ou inatividade destes receptores, o que poderia ser um mecanismo envolvido na infertilidade associada à endometriose. Estudos de metilação no gene codificante das isoformas A e B do receptor de progesterona (*PGR*) mostram que o exon 1 da isoforma PR-B encontra-se hipermetilado e tem sua expressão silenciada em pacientes portadoras da doença. Entretanto ainda não foi avaliado o perfil de metilação deste gene em mulheres inférteis com a doença, o que poderia estar envolvido na infertilidade apresentada por essas pacientes. O objetivo deste estudo foi avaliar o padrão de metilação do gene *PGR* em endométrio eutópico de mulheres com infertilidade relacionada à endometriose e controles inférteis, durante a fase secretora.

Foram realizadas biópsias endometriais de 23 pacientes, divididas em dois grupos: 12 mulheres inférteis sem endometriose (Controle infértil) e 11 mulheres inférteis com endometriose (Endometriose). Todos os endométrios coletados foram confirmados na fase secretora do ciclo através de análise histológica clássica segundo os critérios de Noyes. O DNA genômico foi extraído com o *QIAamp DNA Mini Kit* e modificado utilizando o *EpiTec Bissulfite Kit*. O padrão de metilação das isoformas PR-A e PR-B foi avaliado pela técnica HRM (*High Resolution Melting*). A análise de metilação da isoforma PR-A mostrou que a região analisada encontra-se hipometilada, em que a porcentagem de metilação encontrada foi 0% em ambos os grupos com e sem endometriose. No entanto, no grupo com endometriose, a isoforma PR-B mostrou-se parcialmente metilada na maioria das pacientes com porcentagem de metilação de 50% (n=8), somente uma paciente apresentou 80% de metilação na isoforma B. Para o grupo sem endometriose a isoforma PR-B mostrou-se hipometilada (0%). A hipometilação da isoforma PR-A sugere que este gene encontrar-se na sua forma ativa, sem alterações em sua expressão. No entanto, a hipermetilação da isoforma PR-B nas mulheres com endometriose pode estar relacionada com o silenciamento gênico ou redução da sua expressão, sugerindo que a baixa resposta à progesterona nas mulheres com endometriose pode estar diretamente ligada à redução do número de seus receptores nessas pacientes.

Palavras-chave: Endometriose, Infertilidade, *PGR*, *PR-B*, Metilação, Fase Secretora

Abstract

ROCHA JUNIOR, CV. **Methylation pattern of progesterone receptor (*PGR*) on eutopic endometrium of patients with infertility related to endometriosis during stage secretory.** Medicine University of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Endometriosis is a disease characterized by ectopic growth of endometrial tissue histologically similar to the eutopic endometrium. Among this symptoms, is infertility accounts which is related to decreased endometrial receptivity and resistance to progesterone, important hormone involved in the establishment of this process and the maintenance of pregnancy. The etiology of endometriosis is not well known, but studies suggest that this disorder can be linked to epigenetic mechanisms of regulation of gene expression such as DNA methylation. The endometrial responsiveness to progesterone is mediated by receptors (PR-A and PR-B) which seem to be suppressed in these patients, possibly reducing or inactivity of these receptors, which could be a mechanism involved in the infertility associated with endometriosis. Studies in methylation of the gene encoding the A and B isoforms of progesterone receptor (PGR) showed that exon 1 of the PR-B isoform is hypermethylated and silenced have its expression in patients with the disease. However it has not been rated the methylation profile of this gene in infertile women with the disease, which could be involved in the infertility presented by these patients. The goal from study was to evaluate the methylation pattern of the PGR gene in eutopic endometrium of women with infertility related to endometriosis and infertile controls during the secretory phase. Endometrial biopsies were performed on

23 patients, divided into two groups: 12 infertile women without endometriosis (infertile Control) and 11 infertile women with endometriosis (Endometriosis). All endometrium collected were confirmed in the secretory phase of the cycle by classical histological analysis according to the criteria of Noyes. Genomic DNA was extracted with the QIAamp DNA Mini Kit and using the modified EpiTec Bissulfite Kit. The methylation pattern of PR-A and PR-B isoforms was assessed by HRM technique (Melting High Resolution) Methylation analysis of PR isoform The analyzed showed that the region is hipometilada, wherein the percentage of methylation was found 0% in both the groups with and without endometriosis. However, in the group with endometriosis, the PR-B isoform showed partially methylated in most patients with methylation percentage of 50% (n = 8), only one patient showed methylation in 80% of isoform B. In the group without endometriosis the PR-B isoform was shown hipometilada (0%). The hypomethylation of PR-A isoform suggests that this gene be in its active form, without change in his expression. However, hypermethylation of the PR-B isoform in women with endometriosis may be associated with gene silencing or reducing the expression, suggesting that the low response to progesterone in women with endometriosis can be directly linked to the reduction of its receptors in these patients.

Keywords: Endometriosis, Infertility, *PGR*, *PR-B*, methylation, Secretory Phase

Lista de figuras

Figura 1. Mecanismo de metilação do DNA.....	24
Figura 2. Regulação epigenética em ilhas CpG mediada pela metilação do DNA.....	25
Figura 3. Esquema representativo do gene <i>PGR</i>	27
Figura 4. Esquema representativo da localização das regiões promotoras da PR-A e PR-B localizadas no gene <i>PGR</i>	29
Figura 5. Fluxograma da metodologia.....	40
Figura 6. Eletroforese com DNA extraído das biopsias endometriais.....	42
Figura 7. Eletroforese evidenciando as bandas formadas pelos primers PR-A (100bps) e PR-B (200 bps).....	43
Figura 8. Curva de diluição seriada de controle de DNA padrão com diferentes porcentagens de metilação para isoforma PR-A.....	44
Figura 9. Resultado do HRM para isoforma PR-A.....	44

Figura 10. Curva de diluição seriada de controle de DNA padrão com diferentes porcentagens de metilação para isoforma PR-B.....	45
Figura 11. Resultado do HRM para isoforma PR-B.....	45
Figura 12. Gráfico comparativo das porcentagens de metilação da isoforma PR-B nos grupo endometriose e controle infértil.....	48

Lista de siglas

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

RNA – Ácido Ribonucleico

IMC – Índice de Massa Corporal

PGR/ PR – Gene que expressa o receptor de progesterona

PR-A – Isoforma A do receptor de progesterona

PR-B – Isoforma B do receptor de progesterona

DNMTs – DNA metil transferases

ncRNAs – RNAs não codificadores

VEGF-A – Fator de crescimento vascular endotelial

LH – Hormônio Luteinizante

CpG – Citosina – Fosfato – Guanina (Ilha CpG)

Lista de tabelas e quadros

Quadro 1. Sequencia dos nucleotídeos iniciadores.....37

Tabela 1. Datação histológica.....41

Tabela 2. Homogeneidade dos grupos avaliados.....42

Tabela 3. Avaliação comparativa das porcentagens de metilação entre as isoformas PR-A e PR-B em pacientes inférteis com endometriose.....46

Tabela 4. Avaliação comparativa das porcentagens de metilação entre as isoformas PR-A e PR-B em pacientes inférteis sem endometriose (Controle Infértil).....47

Tabela 5. Teste exato de Fisher para avaliação estatística da comparação das porcentagens aproximadas de metilação da isoforma PR-B entre pacientes inférteis com e sem endometriose.....49

Sumário

Introdução.....	18
Justificativa.....	30
Objetivo.....	31
Hipótese.....	32
Casuística e Metodologia.....	33
Resultados.....	40
Discussão.....	49
Conclusão.....	54
Referências Bibliográficas.....	55

1. Introdução

1.1. Endometriose:

A endometriose é uma doença ginecológica benigna caracterizada pela presença e crescimento de tecido endometrial ectópico funcional, que acomete entre 10 a 15% das mulheres no período reprodutivo[1]. O tecido ectópico é histologicamente semelhante ao endométrio de mulheres sem endometriose e ao endométrio eutópico de mulheres com a doença. Contudo, estes tecidos podem ser distintos tanto bioquímica quanto funcionalmente, incluindo sua receptividade a esteroides, potencial proliferativo e invasivo[2]. Em pacientes com a doença, o tecido endometriótico é comumente encontrado na cavidade pélvica, no peritônio pélvico, ovários, septo reto-vaginal, bexiga, e, mais raramente, no pericárdio, pleura, fígado, rim, e cérebro [3].

A apresentação clínica da endometriose é caracterizada por dismenorréia, dispareunia (dor durante o ato sexual), dor pélvica não cíclica e infertilidade[4]. Contudo, a endometriose pode se mostrar assintomática em 2 a 22% das mulheres. Já a ocorrência de endometriose em mulheres com dismenorréia é de 40 a 60%[5].

A laparoscopia é o método padrão-ouro para o diagnóstico da doença, mas é fortemente sugestiva por meio de exames ginecológicos, ultra-sonografia transvaginal e a ressonância magnética[6] e permite que os implantes peritoneais e ovarianos sejam qualificados de acordo com o tipo de lesão (lesões vermelhas, negras ou brancas). Além disso, para melhor diagnosticar a evolução da doença, a *American Society for Reproductive Medicine* elaborou um sistema de classificação da endometriose em quatro estágios mundialmente aceitos: forma mínima (estágio I), leve (estágio II),

moderada (estágio III) e severa (estágio IV), cuja análise se baseia em um sistema de escores unificados considerando a extensão, profundidade e percentual das lesões, assim como a presença, de endometriomas e aderências pélvicas..

Algumas teorias tentam explicar o surgimento da endometriose. A primeira delas, descrita em 1919 por Meyer, é a teoria da metaplasia celômica, a qual sugere que o epitélio celômico se transforme por metaplasia em tecido semelhante ao endométrio[8]. Partindo deste pressuposto é possível explicar a endometriose ovariana, a serosa peritoneal e a endometriose na ausência de menstruação[9]. Porém, esta teoria não explica a presença de endometriose em locais onde os tecidos não sejam derivados de epitélio celômico. Neste caso, se a metaplasia celômica fosse semelhante à metaplasia comum, a frequência de endometriose seria maior com a idade[8].

Outra teoria, proposta em 1927 por Sampson, é a teoria da implantação metastática, que procura explicar a endometriose através do refluxo menstrual via tuba uterina para dentro da cavidade abdominal, onde algumas células conseguem se implantar. Esta é a teoria mais aceita devido ao fato do fluxo menstrual retrógrado ocorrer em 90% das mulheres[10], da presença de células epiteliais endometriais viáveis no fluido peritoneal[11] e da associação entre fluxo menstrual obstruído e endometriose[12].

Embora a teoria de Sampson seja a mais aceita, somente o refluxo tubário não basta para que a endometriose se estabeleça, pois 90% das mulheres possuem o refluxo menstrual e somente 10 a 15% desenvolvem a doença. Dessa forma, para a ocorrência e manutenção da doença devem ocorrer:

- 1- O escape do sistema imunológico – onde acredita-se que o estabelecimento da doença dependa da capacidade das células endometriais implantadas ectopicamente neutralizarem a resposta imune[13, 14];
- 2- O mecanismo de adesão – através de integrinas e caderinas, importantes para a adesão celular inicial[15];
- 3- O mecanismo de invasão - dependente de metaloproteases da matriz (MMP) e de seus inibidores teciduais específicos (TIMPs)[16];
- 4- O mecanismo de apoptose - em mulheres que apresentam endometriose a porcentagem de células que passa por apoptose é menor, indicando que algumas células podem continuar a exibir atividades fisiológicas fora de seus padrões normais[17];
- 5- Neovascularização - O ambiente peritoneal é altamente angiogênico e o aumento na atividade e nas quantidades do VEGF-A (*vascular endothelial growth factor*) é demonstrado no fluido peritoneal e no endométrio de mulheres com endometriose[18];
- 6- Proliferação das células ectópicas – Acredita-se que a expressão aberrante de aromatase (enzima que catalisa biossíntese de estrógeno) esteja envolvida na patogênese da doença, pois é um estímulo de crescimento independente do ovário[19, 20].

1.2. Infertilidade e endometriose:

A infertilidade está associada à endometriose e ocorre em 30 a 50 % das mulheres com esta desordem[21], contudo esta associação não está completamente elucidada[22]. Estudos corroboram a diminuição da fecundidade em portadoras de endometriose[23]. Entretanto os mecanismos envolvidos na sua etiopatogênese,

principalmente nos casos de endometriose mínima e leve, nas quais não se observa alteração mecânica do trato reprodutivo, ainda não foram esclarecidos[21].

Alguns autores sugerem a ocorrência de menores taxas de fertilização, implantação e gestação em pacientes portadoras de endometriose[24, 25]. Este fato poderia ser decorrente do comprometimento da qualidade oocitária e, conseqüentemente, embrionária e/ou de defeitos endometriais ou ainda da interação entre o endométrio e o embrião[26-28]. Evidências sugerem que defeitos funcionais do endométrio possam contribuir com a diminuída fecundidade apresentada por pacientes com esta doença[29].

Estudos moleculares sobre a falha de implantação embrionária em pacientes com endometriose sugerem a ocorrência de alterações na expressão e tradução de genes do endométrio eutópico envolvidos no processo de implantação[30]. Os receptores de progesterona, fatores de transcrição, enzimas envolvidas no metabolismo de esteroides, entre outros, são genes com expressão aberrante na endometriose durante o período favorável à implantação (janela de implantação)[31]. Entretanto, não há estudos com casuísticas e metodologias adequadas que nos permitam o completo entendimento dos mecanismos envolvidos na redução da fecundidade e potencial piora dos resultados dos procedimentos de reprodução assistida em portadoras de infertilidade relacionada à endometriose.

1.2.1. Receptividade Endometrial:

A implantação é um processo altamente controlado que envolve a interação entre o endométrio e o embrião[32]. O sucesso depende do correto desenvolvimento do

embrião até o estágio de blastocisto e da chegada do embrião em um endométrio receptivo[31, 33, 34].

O endométrio humano passa por mudanças histológicas e estruturais ao longo do ciclo menstrual, que viabilizam a implantação do embrião e o desenvolvimento de uma gestação ou, em caso de ciclos sem concepção, a descamação endometrial luminal e sua posterior regeneração. Estas alterações cíclicas ocorrem nas diferentes fases do ciclo, proliferativa inicial, média e tardia, secretora inicial, média e tardia[35] . Contudo, o endométrio apenas se torna receptivo 6-10 dias após o pico de LH da fase secretora média. [36, 37].

Durante este período receptivo do ciclo menstrual, ocorre no tecido eutópico do endométrio uma maior expressão de diversos fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão e receptores de hormônios, envolvidos diretamente no processo de implantação embrionária[37]. Irregularidades no controle da expressão gênica, incluindo modificações epigenéticas, podem resultar em expressão aberrante de genes e/ou proteínas reguladoras do crescimento e diferenciação endometriais. Os receptores hormonais para progesterona são susceptíveis à modulação epigenética por possuírem em seus promotores regiões passíveis de receberem metilação, um dos mecanismos epigenéticos a ser detalhado no próximo tópico [32].

1.3. Epigenética como uma possível causa para a Endometriose:

Uma outra teoria tem sido formada sobre a etiologia da endometriose, somando-se aos fatos já conhecidos de que a endometriose seja uma doença hormonal com anomalias imunológicas, esta apresenta-se como uma doença multifatorial com a associação de fatores ambientais e genéticos.. Estudos mostram que alguns genes estão

desregulados na endometriose e que essas alterações na expressão gênica estariam relacionadas aos mecanismos epigenéticos de controle como a metilação do DNA, as modificações de histonas e aos RNAs não codificadores[38].

O termo epigenética refere-se as alterações estáveis na expressão gênica que não são explicadas por mudanças na sequência de DNA. Os mecanismos epigenéticos atuam modificando a estrutura da cromatina e/ou de um determinado domínio cromossômico permitindo a ativação de alguns genes e o silenciamento de outros[39, 40]. Dentre os mecanismos epigenéticos de controle da expressão gênica estão as modificações de histonas que alteram a estrutura da cromatina pela adição de grupos químicos às caudas dessas proteínas que formam o nucleossomo. Tais modificações podem ser do tipo fosforilação, ubiquitinação, metilação e acetilação. Essas modificações geram um “código de histonas” que possui importante papel na modulação da transcrição[41, 42]. Outro mecanismo epigenético são os RNAs não codificadores (ncRNAs) que ativam ou silenciam genes em um determinado domínio cromossômico ou pela modulação da estrutura da cromatina[43].

O terceiro mecanismo epigenético de controle da expressão genica e o mais estudado até o momento é a metilação do DNA que consiste na ligação covalente de um radical metil ao carbono 5 de citosinas que precedem uma guanina, estrutura conhecida como dinucleotídeo CpG (Citosina-fosfato-Guanina), resultando na conversão de citosina para 5-metilcitosina na sequencia de DNA[44, 45] (Figura 1). Esta reação é reversível e catalisada pelas enzimas DNMTs (DNA metiltransferase)[45].

Figura 1. Mecanismo de metilação do DNA. O radical metil é adicionado ao carbono 5 da citosina sob a ação da enzima DNA metiltransferase. Esta ligação é reversível [modificado de[45]].

As DNMTs se dividem em duas categorias, de acordo com suas funções biológicas. A primeira categoria diz respeito à manutenção da metilação do DNA, onde encontramos a DNMT1, a metiltransferase mais estudada nos mamíferos e principal metiltransferase. A segunda categoria compreende as enzimas envolvidas na metilação *de novo* do DNA, sendo responsáveis pela estabilização de padrões de metilação do DNA durante o desenvolvimento embrionário. Dentro destas categorias encontramos a DNMT3A e DNMT3B[45]. Acredita-se que o aumento da expressão dessas enzimas é pré-requisito para ocorrer a hipermetilação do DNA. Foi demonstrado que as três enzimas citadas encontram-se altamente expressas no epitélio de implantes endometrióticos quando comparados a um grupo controle sadio ou com tecido endometrial eutópico em mulheres com endometriose, sendo que neste último tecido somente o gene *DNMT3A* é expresso. Com base nestes dados acredita-se que a endometriose possa estar relacionada a hipermetilação do DNA [45].

A metilação do DNA geralmente está relacionada ao silenciamento gênico ou a redução da sua atividade[46, 47] (Figura 2) e, como dito, nos mamíferos este processo é

catalisado pelas DNMTs [48](Figura 1). O mecanismo de metilação do DNA, somado aos outros fatores epigenéticos de regulação da expressão gênica, é fundamental para o correto desenvolvimento de um organismo e auxilia na manutenção da estabilidade genômica atuando no silenciamento de retrotransposons [10].

Figura 2. Regulação epigenética em ilhas CpG mediada pela metilação do DNA. Na ausência de metilação nos dinucleotídeos CpG a transcrição ocorre normalmente, mas quando encontram-se metilado o fator de transcrição não consegue se ligar e o gene é silenciado [modificado de 60]

Dentre as alterações epigenéticas encontradas em pacientes com endometriose, a primeira evidência foi relatada em estudos envolvendo o gene *HOXA 10*, gene com regiões conservadas de fatores transcricionais durante o desenvolvimento do organismo e de importância para a função uterina [45], o qual apresenta-se hipermetilado em mulheres com endometriose [58]. Uma segunda evidência é dada através de estudo que mostra o promotor da isoforma *PR-B* do gene *PGR B* hipermetilado na endometriose. Este fato é concomitante com a redução da expressão do *PR-B*, sugerindo então uma

regulação epigenética na expressão e silenciamento da isoforma B [38], entretanto este estudo não traz informações a respeito da fertilidade do grupo estudado.

Outro indício relevante da atuação dos mecanismos epigenéticos na endometriose é a elevada expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em mulheres com essa doença [49]. Apesar das células somáticas serem geneticamente homogêneas, o que confere diferenças estruturais e funcionais é um sistema de diferenciação da expressão gênica que tem início durante o desenvolvimento embrionário e permanece nas sucessivas mitoses. Essas diferenciações ocorrem devido aos mecanismos epigenéticos de controle da expressão gênica que conferem a cada célula um fenótipo característico[50, 51].

Dentre os genes responsáveis pela expressão dos receptores de esteroides, os receptores de progesterona (*PGR*) apresentam uma região de metilação diferencial em sua região promotora, e estudos mostram que a região promotora da isoforma *PR-B*, mas não a região promotora da isoforma *PR-A*, encontra-se hipermetilada em pacientes com endometriose quando comparadas a pacientes sem a doença [49].

1.4. Receptores de Progesterona:

1.4.1. Progesterona:

A progesterona é um hormônio esteroide que atua neutralizando o efeito de estimulação do crescimento do estrógeno pela indução da diferenciação glandular e estromal do endométrio. Em pacientes com endometriose, o tratamento com progesterona é efetivo na redução do crescimento de tumores endometriais nos quais são expressos os receptores de progesterona. Algumas respostas a este hormônio esteroide são mediadas por receptores. Entretanto, vários estudos tem mostrado que a

regulação da expressão dos receptores de progesterona é complexa [52]. A resistência à progesterona é comumente observada em pacientes portadoras de endometriose e este fato pode ser atribuído a níveis extremamente baixos de receptores deste hormônio no tecido endometriótico [45]. Contudo não há estudos que confrontem dados de pacientes inférteis com endometriose e a diminuição dos receptores.

1.4.2. Receptores de Progesterona:

O gene *PGR*, também conhecido como *PR*, que codifica o receptor de progesterona, é membro da superfamília dos receptores nucleares e necessário para a implantação embrionária e subsequentemente para a decidualização. Localizado na região cromossômica 11q22-q23 e com oito exons [56], este gene possui dois diferentes promotores e sítios de início de tradução no primeiro éxon que produz duas isoformas, A e B (Figura 3)[53].

Figura 3. Esquema representativo do gene *PGR* codificador dos receptores de progesterona PR-A e PR-B evidenciando a localização dos promotores (F1 e F2) e a sobreposição que ocorre durante a transcrição das isoformas proteicas [modificado de 49]

Nos humanos existem duas distintas isoformas do *PGR*, denominados *PR-A* e *PR-B*, ambos codificados por um único gene e diferem pois a isoforma *PR-B* possui 164 aminoácidos a mais na porção N-terminal.

A função do *PR-B* está relacionada a ativação transcricional dominante dos promotores sensíveis à progesterona, enquanto o *PR-A* atua como um repressor dominante sobre o *PR-B* e outros receptores de esteroides (estrogênio, andrógeno, receptores glucocorticóides e mineralocorticoides). Portanto a expressão relativa de *PR-A/PR-B* determina, em partes, a característica celular de responder à progesterona[54]. Embora sejam expressos pelo mesmo gene, cada uma de suas isoformas possui uma região promotora distinta [52].

No endométrio, o nível de ambas isoformas aumenta progressivamente durante a fase proliferativa, pico imediatamente anterior à ovulação e diminui logo após a ovulação, sugerindo que o estradiol estimule os níveis de PR [45]. Contudo, a expressão de *PR-B* é indetectável e a *PR-A* é notadamente reduzida em tecidos endometrióticos.

Um estudo demonstrou que o promotor do gene *PR-B* possui uma região rica em dinucleotídeos CpG, denominadas ilhas CpG as quais encontram-se hipermetiladas em tecidos endometrióticos de pacientes com endometriose em estágios II a IV. Este fato é concomitante com a redução da expressão do *PR-B*, sugerindo então uma regulação epigenética na expressão e silenciamento da isoforma *PR-B* [49] (Figura 4).

Figura 4. Esquema representativo da localização das regiões promotoras da PR-A e PR-B localizadas no gene *PGR*. Nas caixas em cinza acima temos evidenciado a localização das ilhas CpG nas regiões promotoras [modificado de [45]].

2. Justificativa

A progesterona desempenha um papel regulador chave no processo de implantação embrionária, mobilizando diversos moduladores moleculares que sustentam a nidadação embrionária. A insensibilidade à ação da progesterona, entre outros fatores, como epigenéticos, está ligada a defeitos nos receptores deste esteróide (PR-A e/ou PR-B) no endométrio eutópico de portadoras de endometriose, podendo contribuir tanto para a patogênese da doença, como para o comprometimento da implantação embrionária.

Visto que a regulação epigenética desempenha um papel na estabilização da receptividade do endométrio e subsequentemente na implantação do embrião e que a metilação do DNA tem sido diretamente correlacionada com a expressão de genes ligados à implantação, acredita-se que a hipermetilação da região promotora do gene *PGR* em pacientes com infertilidade associada à endometriose possa interferir na eficácia da atuação desse hormônio durante a fase secretora do ciclo, o que poderia justificar o quadro clínico.

3. *Objetivo*

3.1 **Objetivo Geral:**

Avaliar o padrão de metilação do gene que codifica o receptor de progesterona (*PGR*) em tecido endometrial eutópico de pacientes com infertilidade relacionada à endometriose durante a fase secretora do ciclo menstrual comparado ao tecido endometrial eutópico de mulheres inférteis sem endometriose na mesma fase do ciclo.

3.2 **Objetivos Específicos:**

- Verificar o padrão de metilação da isoforma *PR-A* em tecido endometrial de mulheres com endometriose e mulheres inférteis sem endometriose
- Verificar o padrão de metilação da isoforma *PR-B* em tecido endometrial de mulheres com endometriose e mulheres inférteis sem endometriose

2. Hipótese

Alterações relacionadas à isoforma PR-B no padrão de metilação podem afetar a expressão do gene *PGR* durante a fase secretora de pacientes com infertilidade relacionada à endometriose, já que esta é a isoforma efetora da atuação do hormônio progesterona no interior das células.

5. Casuística e Metodologia

5.1 Casuística:

Trata-se de um estudo caso controle comparativo de pacientes inférteis com endometriose comparadas a mulheres controles inférteis sem endometriose, realizado junto ao Laboratório de Ginecologia - Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP) e Laboratório de Biologia da Reprodução do Multiusuário – FMRP-USP. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas FMRP-USP, processo HCRP nº6383/2011.

5.2 -Pacientes:

Foram incluídas pacientes que preencheram os critérios de inclusão preestabelecidos e consentiram em participar do estudo após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram incluídas no estudo 23 pacientes, divididas em dois grupos: Controle infértil (12 pacientes) e endometriose (11 pacientes).

Amostras endometriais de todas as pacientes foram obtidas com uso de Pipelle de Cornier durante a fase secretora do ciclo menstrual.

5.3 - Critérios de Inclusão:

5.3.1 - Grupo controle infértil:

Mulheres com infertilidade por fator masculino e/ou tubário, ciclos menstruais regulares, sem endometriose, doença inflamatória pélvica ou outras anormalidades pélvicas avaliada por laparoscopia diagnóstica, e idade entre 18 e 45 anos.

5.3.2 - Grupo Endometriose:

Mulheres com infertilidade relacionada à endometriose sem outros fatores de infertilidade, diagnosticada com qualquer estágio da doença durante a videolaparoscopia diagnóstica, segundo os critérios definidos pela *American Society for Reproductive Medicine* (1997), que classifica a doença em quatro estágios: mínima (estádio I), leve (estádio II), moderada (estádio III) e grave (estádio IV); ciclos menstruais regulares e idade entre 18 e 45 anos.

5.4 - Critérios de exclusão:

Obesidade, definida pelo índice de massa corporal (IMC) maior ou igual a 30 Kg/m²; presença de doenças sistêmicas tais como: *Diabetes mellitus* ou outras endocrinopatias, doença cardiovascular, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças reumatológicas; infecção pelo vírus HIV ou qualquer infecção ativa; tabagismo, alcoolismo ou drogadição; uso de medicações hormonais e de antiinflamatórios hormonais e não-hormonais nos três meses anteriores à inclusão no estudo.

5.5 - Coleta e processamento do material:

Foram revisados os prontuários das pacientes que buscaram os serviços de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto onde foram selecionadas as pacientes que previamente foram submetidas à videolaparoscopia diagnóstica há menos de 2 anos, que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão e possuíam ciclos menstruais normais (intervalos de 24 a 32 dias $\pm$ 3 dias; 2 a 7 dias de duração e fluxo de até 80 mL por ciclo). A biópsia endometrial foi realizada ambulatoriamente por médico experiente em data agendada conforme o ciclo individual de cada paciente coincidindo com a fase secretora de seus ciclos menstruais. Para a confirmação de que a biópsia endometrial foi realizada no período secretor, todas as amostras foram submetidas à análise histológica clássica com coloração hematoxilina-eosina (HE) e a determinação da fase secretora do ciclo menstrual foi adequada de acordo com o resultado da datação endometrial, segundo os critérios de Noyes (Noyes et al., 1975) realizada por um patologista experiente. Imediatamente após a coleta, as amostras de endométrio foram armazenadas a -80°C imersas em PBS.

5.6 - Extração do DNA:

Aproximadamente 25mg de tecido endométrial foram cortados e lavados em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e armazenados em freezer -80 até a utilização. A extração de DNA foi realizada utilizando o *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, local) segundo recomendações do fabricante. Resumidamente, em cada amostra foram adicionados 180 µl de tampão ATL e 20µl de proteinase K, posteriormente colocados em banho-maria a 56°C até que o tecido estivesse totalmente digerido. Foi acrescido ao material 200 µl de tampão AL e 200 µl de etanol absoluto. O material foi transferido

para coluna e centrifugado, com isso o DNA se aderiu à membrana da mesma. Sucessivas lavagens foram feitas com os tampões AW1 e AW2 (500 µl de cada) para purificação do DNA extraído e ao final foi realizada a eluição do material genômico aderido à membrana com água aquecida a 56°C. O DNA extraído foi mantido congelado a -20°C e sua qualidade e integridade foram avaliadas em gel de agarose a 2% corado com GelRed (Biotium).

5.7 - Modificação por Bissulfito de Sódio:

A seguinte etapa foi a modificação do material genômico utilizando o reagente bissulfito de sódio. Esta modificação permite a conversão *in vitro* das citosinas não metiladas presentes na molécula de DNA em uracilas para assim ser possível a análise do padrão de metilação pela presença das citosinas metiladas que permaneceram no DNA após a modificação. Para tanto, foi utilizado o *EpiTec Bissulfite Kit* (Qiagen, Hilden Germany). Conforme especificações do fabricante 1,5 µg de DNA de cada amostra foram utilizados para a modificação, acrescidos de 85µl de *bissulfite mix* e 35 µl de *protect buffer*. A mistura foi levada ao termociclador onde se dá a modificação do DNA obedecendo à ciclagem de 95°C por 5 minutos, 60°C por 25 minutos, 95°C por 5 minutos, 60°C por 85 minutos, 95°C por 5 minutos, 60°C por 175 minutos e 20°C por 5 minutos. Ao término da ciclagem, o material presente nos tubos foi acrescido de 560 µl de tampão BL e levado para colunas onde o DNA, agora já modificado, se prende à membrana presente na coluna e através de sucessivas centrifugações e lavagens com os tampões BW e BD (500 µl cada) purificando o DNA. A eluição do material aderido à membrana foi realizada finalmente com 20 µl do tampão de eluição EB. O DNA modificado foi estocado à -20° C°.

5.8 – PCR convencional

Para confirmarmos que os primers (quadro 1) estavam se anelando às regiões corretas foi realizada uma PCR convencional onde foi utilizado 1 µl de DNA modificado, 2,5 µl de tampão, 1,5 µl de MgCL₂ (1,5 mM), 0,5 µl de DNTPs (0,2 mM) 1 µl de Primer (0,5 µl do Foward e 0,5 µl do Reverse (0,5 µ)), 0,15 µl de TaqDNA Polimerase (1,25 u) e 18,35 µl de água totalizando um volume de 25 µl por reação.

A ciclagem no termociclador obedeceu a sequencia de um primeiro estagio a 95 °C por 12 minutos, um segundo estagio que se repetiu por 40 vezes de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos, 72 °C por 1 minutos e um terceiro estagio de 72 °C por 8 minutos e 10°C por 10 minutos. Ao final o produto de PCR foi submetido á eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed.

Quadro 1. Sequencia dos nucleotídeos iniciadores

<i>Primer PR-A</i>	<i>Primer PR-B</i>
Foward 5'-GGTTTGTAGGGATAGGATTTT-3'	Foward 5'- AGTATGGAGTTAGTAGAAGTT-3'
Reverse 5'-ACTACCTCCAACCCCCTATAACT-3'	Reverse 5'-TCACAAGTCCAACACTTAAATAACT-3'

5.9 –High Resolution Melting (HRM):

Após a modificação por bissulfito, foi empregada a técnica de *High Resolution Melting* (HRM) onde, a princípio, o DNA é amplificado utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR). Nesta amplificação, as uracilas presentes na molécula de DNA modificado são copiadas nos novos fragmentos como timina, portanto, onde inicialmente no DNA genômico encontrávamos uma citosina, base nitrogenada pirimídica, passamos a encontrar uma timina, base nitrogenada púrica.

Logo em seguida o fragmento recém sintetizado passa por um aumento sucessivo e gradual de temperatura até 95 °C para se observar o ponto de dissociação da dupla fita dos fragmentos. A temperatura em que ocorre essa dissociação é chamada de ponto de dissociação (*melting*) e através dela podemos estimar a porcentagem de metilação do DNA, visto que, quanto maior o número de timinas, mais fácil se dará sua dissociação pois se tratando de uma base púrica realiza somente 2 ligações de hidrogênio no pareamento com a base da fita homóloga de DNA. Em contrapartida, quanto mais citosinas, mais tarde se dará sua dissociação, já que, esta sendo uma base pirimídica, realiza 3 ligações de hidrogênio, o que torna a fita de DNA mais estável em relação a uma fita rica em timinas e pobre em citosinas [57].

Para esta técnica, foram utilizados 2,5 µl de DNA modificado pelo tratamento de bissulfito de sódio de cada uma das amostras, 10 µl de *MeltDoctor* (Applied Biosystems) e 1 µl de cada oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*). Os *Primers* aqui utilizados foram baseados nos já descritos por Wu et al. 2006 [49], e expostos no Quadro 1, que se anelam nas regiões em que se encontram os promotores das isoformas (Figura 3) e cujas sequências estão dispostas no quadro 1. Junto às amostras, na mesma placa, foi acrescentada uma curva de diluição seriada utilizando DNA metilado proveniente do *PCR control DNA Set kit* (Quiagen) contendo DNA a 0%, 20%, 50%, 80% e 100% metilado. A placa contendo todas as amostras e a curva de referência foi levada ao termociclador 77500 FAST (Applied). A reação apresentava um volume total de 20 µl por reação que continha 2,5 µl de DNA modificado ou curva de diluição, 10 µl de *MelthDoctor*, 0,5 µl de primer forward (PR-A ou PR-B) à 0,5 µ e 0,5 µl de primer reverse (PR-A ou PR-B) à 0,5 µ e 6,5 µl de água.

5.10– Dosagem sérica de progesterona:

No momento de cada coleta de endométrio, foi também coletado sangue de cada uma das pacientes para dosagem sérica do nível de progesterona, a fim de se confirmar a ovulação, confirmando assim que as coletas foram realizadas após a ovulação (progesterona ≥ 3 ng/ml). A dosagem foi realizada por quimiluminescência com o kit IMMULITE 2000 (Siemens).

Também foi avaliada a homogeneidade dos grupos avaliando as variáveis IMC, idade, peso, altura e tamanho do ciclo (período compreendido entre o primeiro dia da menstruação e o primeiro dia da menstruação seguinte)

5.11 – Análise dos Resultados Obtidos por HRM e Análise estatística:

As variáveis quantitativas avaliadas foram comparadas entre os grupos utilizando-se o teste *t-Student*. Os dados obtidos pelo HRM foram lidos pelo programa *HRM Software* que nos mostra a porcentagem de metilação encontrada em cada amostra. Para comparação das porcentagens de metilação das isoformas PR-A e PR-B dos grupos amostrais foi realizado o teste exato de Fisher através do programa SAS 9.0. O nível de significância utilizado foi de 5% ($P \leq 0,05$). Um fluxograma contendo a sequência de toda a metodologia descrita está disposto na Figura 5

Figura 5. Fluxograma da metodologia

6. Resultados

Para dar início aos experimentos que avaliaram o padrão de metilação de cada uma das isoformas do *PGR* foi realizada a datação histológica das amostras segundo os critérios estabelecidos por Noyes 1975, para confirmação da amostra nos parâmetros estabelecidos. O resultado da datação (Tabela 1) confirma que todas as amostras foram coletadas dentro da fase secretora do período menstrual das pacientes.

Tabela 1. Datação histológica

Legenda da Amostra	Grupo	Estagio	Datação (dia do ciclo)	Intervalo do ciclo (dias)
2	Endometriose	2	24	28
3	Endometriose	1	24	28
4	Controle Infértil	-	24	28
5	Endometriose	3	16	24
6	Controle Infértil	-	17	28
8	Controle Infértil	-	21	28
9	Controle Infértil	-	17	27
10	Controle Infértil	-	17	29
12	Endometriose	1	21	28
13	Controle Infértil	-	15	25
14	Endometriose	4	26	28
15	Controle Infértil	-	15	28
17	Controle Infértil	-	18	28
19	Controle Infértil	-	19	28
20	Controle Infértil	-	24	30
21	Controle Infértil	-	26	32
22	Endometriose	1	23	28
25	Endometriose	4	19	30
26	Endometriose	3	22	30
27	Endometriose	4	23	28
28	Endometriose	2	23	28
31	Controle Infértil	-	24	28
32	Endometriose	1	24	28

Os valores de média e desvio padrão das idades, altura, peso, IMC e dia do ciclo das pacientes estão apresentadas na tabela 2. Não foram observadas diferenças em nenhuma características avaliadas entre os grupos com endometriose e controle infértil

Tabela 2. Características quantitativas dos grupos avaliados.

Grupo	Idade (Anos)	Altura (Metros)	Peso (KG)	IMC	Tamanho do Ciclo (Dias)
Controle Infértil	36,27	1,6	62,03	24,12	27,92
Endometriose	35,48	1,64	67,68	25,29	28
Valor p*	0,67	0,21	0,28	0,55	0,88

P*=nível de significância

Após a confirmação de que as amostras estavam adequadas ao proposto, o DNA foi extraído como descrito anteriormente e uma eletroforese foi realizada em algumas amostras para validação da integridade do material genético extraído, como mostra a Figura 6. O material se mostrou íntegro e apto para dar prosseguimento aos experimentos.

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed com DNA extraído das biópsias endometriais .

Após a amplificação do DNA modificado foi observado que os primers para as isoformas se anelavam nas regiões que compreendiam às regiões para as quais foram desenhados devido às bandas formadas de tamanho molecular correspondente como mostra a Figura 7.

Figura 7. Eletroforese evidenciando as bandas formadas pelos primers PR-A (100bps) e PR-B (200 bps)

A curva de diluição seriada segundo as porcentagens de metilação adicionadas estão apresentadas nas figuras 8 e 10, em que pode-se observar a separação das curvas de acordo com sua porcentagem de metilação. A análise da porcentagem de metilação dos genes PR-A e PR-B evidenciada pela técnica HRM estão apresentadas nas Figuras 9 e 11.

Figura 8. Curva de diluição seriada de controle de DNA padrão com diferentes porcentagens de metilação para isoforma PR-A.

Figura 9. Resultado do HRM para isoforma PR-A

Figura 10. Curva de diluição seriada de controle de DNA padrão com diferentes porcentagens de metilação para isoforma PR-B.

Figura 11. Resultado do HRM para isoforma PR-B.

O observado nas figuras foi transposto para a Tabelas 3 e 4 para facilitar a interpretação dos resultados.

Tabela 3. Avaliação comparativa das porcentagens de metilação entre as isoformas PR-A e PR-B em pacientes inférteis com endometriose.

Amostra	% aproximada de Metilação (PR-A)	% aproximada de Metilação (PR-B)
2	0%	50%
3	0%	0-20%
5	0%	50%
12	0%	50%
14	0%	80%
22	0%	ND
25	0%	0-20%
26	0%	50%
27	0%	50%
28	0%	50%
32	0%	50%

*ND - representa amostra que não mostrou amplificação, portando não sendo lida durante o procedimento

Podemos observar que no grupo endometriose, a isoforma PR-A encontra-se hipometilada com 0% porcentagem de metilação, Contudo a isoforma PR-B mostrou-se parcialmente metilada na maioria das pacientes com porcentagem de metilação de 50% (n=8), somente uma paciente apresentou 80% de metilação na isoforma B.

Tabela 4. Avaliação comparativa das porcentagens de metilação entre as isoformas PR-A e PR-B em pacientes inférteis sem endometriose (Controle Infértil).

Amostra	% aproximada de Metilação (PR-A)	% aproximada de Metilação (PR-B)
4	0%	0-20%
6	0%	50%
8	0%	50%
9	0%	0-20%
10	0%	0-20%
13	0%	ND
15	0%	0-20%
17	0%	0-20%
19	0%	0-20%
20	0%	ND
21	0%	ND
31	0%	0-20%

*ND representa amostras que não mostram amplificação, portando não sendo lidas durante o procedimento

Observando o resultado obtido no grupo controle, a isoforma PR-A se mostrou hipometilada, contudo a isoforma PR-B mostrou diferentes níveis de metilação também neste grupo, porém as porcentagens variando somente na ampliação de 0 a 50% com a maioria das pacientes com metilação de 0-20% (n=7) e duas com porcentagem igual a 50%. A Figura 12 correlaciona os dados obtidos em ambos os grupos .

Figura 12. Gráfico comparativo das porcentagens de metilação da isoforma PR-B nos grupo endometriose e controle infértil

*ND – Amostras que não mostraram amplificação durante o experimento

Analisando a isoforma PR-B, o grupo controle infértil mostrou a maioria das pacientes com metilação em somente 0-20% das ilhas CpGs do gene. Já no grupo endometriose, a maioria das pacientes mostrou metilação em 50% das ilhas CpGs.

Para quantificar estatisticamente foi realizado o teste exato de Fisher para comparação das porcentagens de metilação entre os grupos para a isoforma e PR-B e o resultado está demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5. Teste exato de Fisher para avaliação estatística da comparação das porcentagens aproximadas de metilação da isoforma PR-B entre pacientes inférteis com e sem endometriose

PR-B Porcentagem (%) Metilação	Controle Infértil	Endometriose	Total
0 - 20%	7 77,8%	2 20,0%	9
50%	2 22,2%	7 70,0%	9
80%	0 0,0%	1 10,0%	1
Total	9	10	19
Valor p*	0,04		

P*=nível de significância

A análise estatística nos permite verificar uma diferença significativa ($p = 0,04$) entre os grupos. Confrontando os dados, observamos que no grupo Controle Infértil a prevalência de pacientes com porcentagem entre 0-20% de metilação é de 77,8% comparando-se com o grupo Endometriose, enquanto que no grupo Endometriose a prevalência de porcentagem de metilação de 50% é de 70% em relação ao grupo Controle Infértil.

7. *Discussão*

A endometriose é uma doença ginecológica que está vinculada à infertilidade, contudo as relações de causa e efeito não estão plenamente estabelecidas. A resistência à progesterona é uma condição apresentada por grande parte das pacientes portadoras de endometriose e colabora para a infertilidade apresentada neste grupo[45]. A atuação deste hormônio ocorre através de seus receptores que encontram-se com sua expressão suprimida em pacientes com endometriose[45]. É sabido que a região promotora do PR-B encontra-se parcialmente metilada em pacientes com endometriose[49] contudo, nenhuma pesquisa objetivou-se em avaliar o perfil epigenético deste gene em pacientes inférteis com endometriose e elucidar seu possível papel no comprometimento da receptividade endometrial e, conseqüentemente, na infertilidade apresentada por grande parte das portadoras da doença. A baixa contagem de receptores de progesterona pode ser o elo de ligação entre infertilidade e endometriose e a investigação do perfil epigenético dos promotores do gene que codificam para os receptores de progesterona se faz importante para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nessa doença.

Em nosso trabalho, confrontamos um grupo de pacientes inférteis com endometriose a um grupo infértil sem endometriose. Encontramos que, na endometriose, o gene *PR-B* encontra-se parcialmente metilado (50%) na região analisada. Diferentemente, nas pacientes inférteis sem endometriose, observou-se uma menor porcentagem de metilação (0-20%) na região analisada do gene *PR-B*, o que sugere que a doença possa estar afetando diretamente a expressão desta isoforma. O gene PR-B, que codifica para a isoforma B, é um ativador transcricional dominante dos

promotores sensíveis à progesterona [54]. Sabe-se que a progesterona é o esteroide predominante da fase secretora e controla todas as alterações moleculares que promovem o estabelecimento da receptividade endometrial e propiciam a interação entre o endométrio e o embrião visando a implantação embrionária [64]. Sua ação se dá em ligações específicas ligante-receptor, que desencadeiam uma cascata gênica cujos transcritos atuam autocrina, parácrina ou endocrinamente, com consequentes alterações histológicas, moleculares e funcionais [64]. Já é sabido que a metilação do promotor leva à diminuição da expressão ou até ao silenciamento total do gene [59]. Esta maior porcentagem de metilação observada possa estar contribuindo para as alterações no endometriais, e consequentemente afetando a implantação embrionária e a fertilidade destas pacientes. Ainda, visto que o grupo controle é constituído por pacientes inférteis sem endometriose, com critérios restritos de elegibilidade, o aumento da porcentagem de metilação nas pacientes inférteis com endometriose pode ser atribuído à presença da doença.

O estudo de Wu, et al. 2006 [49] utilizou a técnica *Methylation Specific PCR* (MSP), que analisa a metilação do DNA através da técnica de PCR utilizando *primers* específicos para o DNA metilado e outro para o segmento não metilado, para avaliar a metilação do gene *PR-B* em amostras de células epiteliais de focos endometrióticos de pacientes com a doença, tendo encontrado que a isoforma apresentava bandas de DNA metiladas e não metiladas, sugerindo que a região promotora do *PR-B* tem uma tendência a estar parcialmente metilada na endometriose, resultado confirmado através de sequenciamento e que vai ao encontro do que observamos em nosso estudo. No entanto, o foco destes autores foi avaliar o papel da metilação deste gene na patogenia da endometriose e não da infertilidade associada a essa condição, uma vez que incluiu

pacientes com a doença independentemente da presença de infertilidade e avaliou os implantes ectópicos ao invés do endométrio eutópico.

O gene *PR-A* por sua vez, atua como modulador da transcrição, podendo reprimir a atividade transcricional do próprio *PR-B* e de outros receptores esteroides [49[54]] . Em nosso grupo de estudo o gene que expressa esta proteína não mostrou sinais de metilação em seu promotor, sugerindo não haver alterações na sua expressão. No estudo de Wu et al.[49] o gene *PR-A* também mostrou-se não metilado revelando, possivelmente, que na endometriose não há interferência quanto à metilação desse gene.

Em um trabalho recente, [60] nosso grupo avaliou ultraestruturalmente o endométrio eutópico de pacientes inférteis com e sem endometriose mínima/leve (também incluídas no presente estudo) durante a janela de implantação, com o objetivo de avaliar a presença e o desenvolvimento de pinopodes, estruturas epiteliais que parecem ser importantes marcadores ultraestruturais de receptividade endometrial[62] , apontados como biomarcadores clássicos da janela de implantação no epitélio endometrial humano [63]. O desenvolvimento destas estruturas está associado à concentração de progesterona e a seus receptores [61]. Em uma análise descritiva, foi observado o predomínio de pinopodes em regressão e menor porcentagem de pinopodes desenvolvidos e em desenvolvimento em pacientes inférteis com endometriose inicial comparadas a um grupo controle infértil, porém, sem endometriose. Isto sugere uma assincronia na expressão destas estruturas em pacientes inférteis com endometriose e consequente interferência na implantação e fertilidade destas pacientes[60].

Uma vez que o desenvolvimento dos pinopodes está vinculado à atuação da progesterona através de seus receptores, podemos observar um paralelo interessante entre o aumento da metilação da isoforma *PR-B*, receptor dominante na atuação da

progestetona no interior da célula [54], e o declínio da presença e desenvolvimento de pinopodes no endométrio eutópico de pacientes inférteis com endometriose[60].

A alteração no desenvolvimento de pinopodes num grupo com amostras também incluídas neste estudo corrobora a idéia de que a metilação parcial do promotor do *PR-B* pode interferir em sua expressão, acarretando em comprometimento da receptividade endometrial (alterações dos pinopodes) e consequentemente, da fertilidade da paciente.

Para conclusões mais precisas, futuros estudos sobre a expressão do gene PGR, em especial do gene que codifica para a isoforma B, o *PR-B*, em pacientes inférteis com endometriose seria importante para confirmar os presentes achados e aprofundar o entendimento da metilação deste gene como um mecanismo envolvido na etiopatogênese da infertilidade associada à endometriose. Contudo, os dados aqui mostrados indicam que há um importante aumento da metilação da região promotora do gene *PR-B* em pacientes inférteis com endometriose, e nos permitem sugerir que a metilação parcial na região promotora desse gene possa resultar em alterações na expressão desse gene e tradução da sua proteína, levando a crer que fatores epigenéticos possam estar envolvidos no comprometimento da fertilidade das mulheres com endometriose.

8. Conclusão

Concluimos que o promotor do gene que expressa o receptor de progesterona (isoforma PR-B) encontra-se parcialmente metilado em pacientes inférteis com endometriose, de maneira distinta de pacientes com endometriose e sem infertilidade. A metilação parcial deste promotor pode causar alterações na expressão deste gene e influenciar diretamente a resposta das células endometriais à progesterona, consequentemente, impactando a implantação embrionária e a fertilidade destas pacientes.

9. Referências Bibliográficas

1. Yang, W.C., et al., *Serum and endometrial markers*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004. **18**(2): p. 305-18.
2. Nap, A.W., et al., *Pathogenesis of endometriosis*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004. **18**(2): p. 233-44.
3. Giudice, L.C. and L.C. Kao, *Endometriosis*. Lancet, 2004. **364**(9447): p. 1789-99.
4. Poliness, A.E., et al., *Proteomic approaches in endometriosis research*. Proteomics, 2004. **4**(7): p. 1897-902.
5. Farquhar, C.M., *Extracts from the "clinical evidence". Endometriosis*. Bmj, 2000. **320**(7247): p. 1449-52.
6. Thomas, E.J., *Endometriosis, 1995--confusion or sense?* Int J Gynaecol Obstet, 1995. **48**(2): p. 149-55.
7. Birmingham, A., *Endometriosis and infertility*. Fertil Steril, 2006. **86**(5 Suppl 1): p. S156-60.
8. Vinatier, D., et al., *Theories of endometriosis*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2001. **96**(1): p. 21-34.
9. El-Mahgoub, S. and S. Yaseen, *A positive proof for the theory of coelomic metaplasia*. Am J Obstet Gynecol, 1980. **137**(1): p. 137-40.
10. Halme, J., et al., *Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis*. Obstet Gynecol, 1984. **64**(2): p. 151-4.

11. Kruitwagen, R.F., et al., *Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase*. Fertil Steril, 1991. **55**(2): p. 297-303.
12. Olive, D.L. and D.Y. Henderson, *Endometriosis and mullerian anomalies*. Obstet Gynecol, 1987. **69**(3 Pt 1): p. 412-5.
13. Lebovic, D.I., M.D. Mueller, and R.N. Taylor, *Immunobiology of endometriosis*. Fertil Steril, 2001. **75**(1): p. 1-10.
14. Siristatidis, C., et al., *Immunological factors and their role in the genesis and development of endometriosis*. J Obstet Gynaecol Res, 2006. **32**(2): p. 162-70.
15. Beliard, A., et al., *Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis*. Fertil Steril, 1997. **67**(2): p. 266-72.
16. Rodgers, W.H., et al., *Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones*. J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 946-53.
17. Dmowski, W.P., et al., *Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis*. Hum Reprod, 2001. **16**(9): p. 1802-8.
18. Donnez, J., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis*. Hum Reprod, 1998. **13**(6): p. 1686-90.
19. Zeitoun, K.M. and S.E. Bulun, *Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target*. Fertil Steril, 1999. **72**(6): p. 961-9.
20. de Abreu, L.G., et al., *Reduced aromatase activity in granulosa cells of women with endometriosis undergoing assisted reproduction techniques*. Gynecol Endocrinol, 2006. **22**(8): p. 432-6.

21. Holoch, K.J. and B.A. Lessey, *Endometriosis and infertility*. Clin Obstet Gynecol, 2010. **53**(2): p. 429-38.
22. Minjarez, D.A. and W.D. Schlaff, *Update on the medical treatment of endometriosis*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2000. **27**(3): p. 641-51.
23. Garrido, N., et al., *The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility*. Hum Reprod Update, 2002. **8**(1): p. 95-103.
24. Barnhart, K., R. Dunsmoor-Su, and C. Coutifaris, *Effect of endometriosis on in vitro fertilization*. Fertil Steril, 2002. **77**(6): p. 1148-55.
25. Al-Fadhli, R., et al., *Effects of different stages of endometriosis on the outcome of in vitro fertilization*. J Obstet Gynaecol Can, 2006. **28**(10): p. 888-91.
26. Brizek, C.L., et al., *Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis--an association with endometriosis*. J Assist Reprod Genet, 1995. **12**(2): p. 106-12.
27. Kumbak, B., et al., *In vitro fertilization in normoresponder patients with endometriomas: comparison with basal simple ovarian cysts*. Gynecol Obstet Invest, 2008. **65**(3): p. 212-6.
28. Pellicer, A., et al., *Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction*. Hum Reprod, 1995. **10 Suppl 2**: p. 91-7.
29. *Endometriosis and infertility*. Fertil Steril, 2006. **86**(5 Suppl 1): p. S156-60.
30. Wei, Q., et al., *Reduced expression of biomarkers associated with the implantation window in women with endometriosis*. Fertil Steril, 2009. **91**(5): p. 1686-91.

31. Giudice, L.C., et al., *The molecular basis for implantation failure in endometriosis: on the road to discovery*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **955**: p. 252-64; discussion 293-5, 396-406.
32. Munro, S.K., et al., *Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle*. Mol Hum Reprod. **16**(5): p. 297-310.
33. Minici, F., et al., *Endometriosis and human infertility: a new investigation into the role of eutopic endometrium*. Hum Reprod, 2008. **23**(3): p. 530-7.
34. Singh, M., P. Chaudhry, and E. Asselin, *Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors*. J Endocrinol. **210**(1): p. 5-14.
35. Talbi, S., et al., *Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women*. Endocrinology, 2006. **147**(3): p. 1097-121.
36. Riesewijk, A., et al., *Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology*. Mol Hum Reprod, 2003. **9**(5): p. 253-64.
37. Aghajanova, L., A.E. Hamilton, and L.C. Giudice, *Uterine receptivity to human embryonic implantation: histology, biomarkers, and transcriptomics*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(2): p. 204-11.
38. Guo, S.W., *Epigenetics of endometriosis*. Mol Hum Reprod, 2009. **15**(10): p. 587-607.
39. Waddington, C.H., *Canalization of development and the inheritance of the acquired characters*. Nature, 1942. **150**(3811): p. 563-565.

40. Haig, D., *The (dual) origin of epigenetics*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2004. **69**: p. 67-70.
41. Reik, W., F. Santos, and W. Dean, *Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy*. Theriogenology, 2003. **59**(1): p. 21-32.
42. Wang, Z., D.E. Schones, and K. Zhao, *Characterization of human epigenomes*. Curr Opin Genet Dev, 2009. **19**(2): p. 127-34.
43. Mohammad, F., T. Mondal, and C. Kanduri, *Epigenetics of imprinted long noncoding RNAs*. Epigenetics, 2009. **4**(5): p. 277-86.
44. Geiman, T.M. and K. Muegge, *DNA methylation in early development*. Mol Reprod Dev. **77**(2): p. 105-13.
45. Nasu, K., et al., *Aberrant DNA methylation status of endometriosis: epigenetics as the pathogenesis, biomarker and therapeutic target*. J Obstet Gynaecol Res. **37**(7): p. 683-95.
46. Kiefer, J.C., *Epigenetics in development*. Dev Dyn, 2007. **236**(4): p. 1144-56.
47. Kurihara, Y., et al., *Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1*. Dev Biol, 2008. **313**(1): p. 335-46.
48. Bestor, T.H., *The DNA methyltransferases of mammals*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(16): p. 2395-402.
49. Wu, Y., et al., *Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (PR-B) in endometriosis*. Epigenetics, 2006. **1**(2): p. 106-11.
50. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.

51. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nat Genet, 2003. **33** Suppl: p. 245-54.
52. Sasaki, M., et al., *Progesterone receptor B gene inactivation and CpG hypermethylation in human uterine endometrial cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(1): p. 97-102.
53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5241>.
54. Lee, B., H. Du, and H.S. Taylor, *Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium*. Biol Reprod, 2009. **80**(1): p. 79-85.
55. Engehausen, D.G., et al., *Polymorphisms in the human progesterone receptor (PGR) gene of two human prostate adenocarcinoma cell lines*. Anticancer Res, 2005. **25**(3A): p. 1607-9.
56. Li, L.C. and R. Dahiya, *MethPrimer: designing primers for methylation PCRs*. Bioinformatics, 2002. **18**(11): p. 1427-31.
57. S, Taylor, et al., *A Practical guide to high resolution melt analysis genotyping*. BioRad Tch Note 6004
58. Zanatta, A., et al., *The role of Hoxa10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis and its related infertility: a review*. J Assist Reprod Genet. 2010 Dec; **27**(12): 701–710.
59. Bird, A.P. *The relationship of DNA methylation to cancer*. Cancer Surv. 1996; 2887-101
60. Da Broi, M.G., et al., *Avaliação ultraestrutural do endométrio eutópico de pacientes inférteis com e sem endometriose mínima/leve durante janela de*

implantação: Estudo piloto. XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida. 2014, 18(3): 93

61. Stavreus-Evers, A., et al., *Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors*. Fertility and Sterility. 2001 Oct; 76(4): 782-791.
62. Makrigiannakis, A. et al. The expression of receptivity markers in the fallopian tube epithelium. Histochem Cell Biol, v.132, n.2, Aug, p.159-67. 2009.
63. XU, B. et al. Pinopodes, leukemia inhibitory factor, integrin-beta3, and mucin-1 expression in the peri-implantation endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss. Fertil Steril, v.98, n.2, Aug, p.389-95. 2012.
64. Ace, C., *et al*. Microarray profiling of progesterone-regulated endometrial genes during the rhesus monkey secretory phase. Reproductive Biology and Endocrinology. 2:54. 2004

Anexo 1- Manuscrito

Padrão de metilação do receptor de progesterona (PGR) em endométrio eutópico de pacientes com infertilidade relacionada à endometriose durante a fase secretora

Rocha-Junior, C.V.; Da Broi, M.G. Furtado, C.L.M.; Navarro, P.A.A.S.; Meola, J. Ferriani, R.A.

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP – USP

Depto. De Ginecologia e Obstetrícia

RESUMO

Objetivo: A infertilidade esta associada á ate 50% das pacientes com endometriose, contudo esta relação não tem suas causas bem estabelecidas. A receptividade á progesterona encontra-se suprimida nestas pacientes e a regulação da expressão de seus receptores, expressos pelo gene PGR em duas isoformas (PR-A e PR-B) pode estar sob modulação epigenética. Este trabalho objetivou avaliar o padrão epigenético da região promotora do gene PGR em mulheres inférteis com endometriose durante a fase secretora do ciclo menstrual comparado com mulheres inférteis sem endometriose no mesmo período. **Metodologia:** Biópsias endometriais foram obtidas de 27 pacientes divididas em dois grupo, endometriose e contre infértil. Sangue de cada pacientes foi coletado para dosagem sérica de progesterona. Parte de cada amostra foi enviada para avaliação histológica para validação do período menstrual.O restante de cada biopsia foi utilizada para extração de DNA. O DNA oi extraído com KIT e

posterior a isso foi submetido á tecnica de modificação por bissulfito de sódio. Ao final todas as amostras de DNA modificado foram utilizadas para a tecnica de High Melting Resolution (HRM). A análise estatística realizada foi o teste exato de Fisher.

Resultados: A isoforma A não apresentou alteração em sua metilação sugerindo que na endometriose não há interferência quanto á metilação na expressão da isoforma PR-A. A isoforma B apresentou-se parcialmente metilada (50% da região promotora) no grupo endometriose, o que pode levar á redução da expressão do receptor afetando a fertilidade das pacientes diagnosticadas com endometriose.

INTRODUÇÃO

Endometriose e infertilidade

A endometriose é uma doença ginecológica benigna caracterizada pela presença e crescimento de tecido endometrial ectópico funcional que acomete entre 10 a 15% das mulheres no período reprodutivo[1].

O tecido ectópico é histologicamente semelhante ao endométrio de mulheres sem endometriose e ao endométrio eutópico de mulheres com endometriose. Contudo estes tecidos podem ser distintos tanto bioquímica quanto funcionalmente, incluindo sua receptividade a esteroides, potencial proliferativo e invasivo[2]. O tecido endometriótico é comumente encontrado na cavidade pélvica, no peritônio pélvico, ovários, septo reto-vaginal, pericárdio, pleura, fígado, rim, bexiga, cérebro e raramente em homens[3].

A apresentação clínica da endometriose é caracterizada por dismenorréia, dispareunia (dor durante o ato sexual), dor pélvica não cíclica e infertilidade[4].

Contudo a endometriose pode se mostrar assintomática em 2 a 22% das mulheres. Já a ocorrência de endometriose em mulheres com dismenorréia é de 40 a 60%[5].

A laparoscopia é o método padrão-ouro para o diagnóstico da doença, mas é fortemente sugestiva por meio de exames ginecológicos, ultra-sonografia transvaginal e a ressonância magnética[6].

De acordo com a *American Society for Reproductive Medicine*, os implantes peritoneais e ovarianos podem ser qualificados em lesões vermelhas, negras e brancas. Além disso, para melhor diagnosticar a evolução da doença, esta mesma entidade elaborou um sistema de classificação da endometriose em quatro estádios mundialmente aceitos: forma mínima (estádio I), leve (II), moderada (III) e severa (IV). Esta análise se baseia em um sistema de escores unificados nos quatro estádios, na avaliação percentual e volume das lesões. Contudo, este método de classificação, que é feito de acordo com a observação de cada patologista, pouco pode prever a chance de gravidez após terapia[7].

Algumas teorias tentam explicar as causas da endometriose. A mais aceita delas foi proposta em 1927 por Sampson, é a teoria da implantação metastática, que procura explicar a endometriose através do refluxo menstrual via tuba uterina para dentro da cavidade abdominal, onde algumas células conseguem se implantar. Esta é a teoria mais aceita devido ao fato do fluxo menstrual retrógrado ocorrer em 90% das mulheres[10], da presença de células epiteliais endometriais viáveis no fluido peritoneal[11] e da associação entre fluxo menstrual obstruído e endometriose[12].

Embora a teoria de Sampson seja a mais aceita, somente o refluxo tubário não basta para que a endometriose se estabeleça, pois 90% das mulheres possuem o refluxo menstrual e somente 10 a 15% desenvolvem a doença.

A infertilidade está associada à endometriose e ocorre em 30 a 50 % das mulheres com esta desordem[21], contudo esta associação não está completamente elucidada[22]. Estudos corroboram a diminuição da fecundidade em portadoras de endometriose[23]. Entretanto os mecanismos envolvidos na sua etiopatogênese, principalmente nos casos de endometriose mínima e leve, nas quais não se observa alteração mecânica do trato reprodutivo, ainda não foram esclarecidos[21].

Alguns autores sugerem a ocorrência de menores taxas de fertilização, implantação e gestação em pacientes portadoras de endometriose[24, 25]. Este fato poderia ser decorrente do comprometimento da qualidade oocitária e, conseqüentemente, embrionária e/ou de defeitos endometriais ou ainda da interação entre o endométrio e o embrião[26-28]. Evidências sugerem que defeitos funcionais do endométrio possam contribuir com a diminuída fecundidade apresentada por pacientes com esta doença[29].

Estudos moleculares sobre a falha de implantação embrionária em pacientes com endometriose sugerem a ocorrência de alterações na expressão e tradução de genes do endométrio eutópico envolvidos no processo de implantação[30]. Os receptores de progesterona, fatores de transcrição, enzimas envolvidas no metabolismo de esteroides, entre outros, são genes com expressão aberrante na endometriose durante o período favorável à implantação (janela de implantação)[31]. Entretanto, não há estudos com casuísticas e metodologias adequadas que nos permitam o completo entendimento dos mecanismos envolvidos na redução da fecundidade e potencial piora dos resultados dos procedimentos de reprodução assistida em portadoras de infertilidade relacionada à endometriose.

Receptividade endometrial e epigenética

O endométrio humano passa por mudanças histológicas e estruturais ao longo do ciclo menstrual, que viabilizam a implantação do embrião e o desenvolvimento de uma gestação, contudo, o endométrio apenas se torna receptivo 6-10 dias após o pico de LH da fase secretora média. [36, 37].

Durante este período receptivo do ciclo menstrual, ocorre no tecido eutópico do endométrio uma maior expressão de diversos fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão e receptores de hormônios, envolvidos diretamente no processo de implantação embrionária[37]. Irregularidades no controle da expressão gênica, incluindo modificações epigenéticas, podem resultar em expressão aberrante de genes e/ou proteínas reguladoras do crescimento e diferenciação endometriais. Os receptores hormonais para progesterona são susceptíveis à modulação epigenética por possuírem em seus promotores regiões passíveis de receberem metilação [32].

Uma outra teoria tem sido formada sobre a etiologia da endometriose, somando-se aos fatos já conhecidos de que a endometriose seja uma doença hormonal com anomalias imunológicas, podendo estar relacionada com alterações ambientais e com a predisposição genética. Estudos mostram que alguns genes estão desregulados na endometriose e que essas alterações na expressão gênica estariam relacionadas aos mecanismos epigenéticos de controle, como a metilação do DNA [38].

Em pacientes com endometriose foi demonstrado que as DNA metil-transferases (DNMT) encontram-se superexpressas no epitélio de implantes endometrióticos quando comparados a um grupo controle sadio ou com tecido endometrial eutópico em mulheres com endometriose, sendo que neste último tecido somente a DNMT3A está

superexpressa. Com base nestes dados acredita-se que a hipermetilação ocorra na endometriose[45].

Receptores de Progesterona

A progesterona é um hormônio esteroide que atua neutralizando o efeito de estimulação do crescimento do estrógeno pela indução da diferenciação glandular e estromal do endométrio. A resistência à progesterona é comumente observada em pacientes portadoras de endometriose e este fato pode ser atribuído a níveis extremamente baixos de receptores deste hormônio em tecido endometriótico [45], contudo não há estudos que confrontem dados de pacientes inférteis com endometriose e a diminuição dos receptores.

O gene *PGR* codifica o receptor de progesterona, é membro da superfamília dos receptores nucleares e necessário para a implantação embrionária e subsequentemente para a decidualização. Localizado na região cromossômica 11q22-q23 e com oito exons [56], este gene possui dois diferentes promotores e sítios de início de tradução no primeiro éxon que produz duas isoformas, A e B

Nos humanos existem duas distintas isoformas do receptor de progesterona denominados *PR-A* e *PR-B*, ambos codificados por um único gene e diferem entre si pela isoforma *PR-B* conter 164 aminoácidos N-terminal.

A função do *PR-B* é ser um ativador transcricional dominante dos promotores sensíveis à progesterona, enquanto o *PR-A* atua como um repressor dominante sobre o *PR-B* e outros receptores de esteroides (estrogênio, andrógeno, receptores glucocorticóides e mineralocorticoides). Portanto a expressão relativa de *PR-A/PR-B* determina, em partes, a característica celular de responder à progesterona[54]. Embora

sejam expressos pelo mesmo gene, cada uma de suas isoformas possui uma região promotora distinta[52].

No endométrio, o nível de ambas isoformas aumenta progressivamente durante a fase proliferativa, pico imediatamente anterior à ovulação e diminui logo após a ovulação, sugerindo que o estradiol estimule os níveis de PR [45]. Contudo, a PR-B é indetectável e a PR-A é notadamente reduzida em tecidos endometrióticos. A baixa relação PR-A/PR-B tem sido sugerida como um dos possíveis mecanismos de resistência à progesterona na endometriose.

Um estudo demonstrou que o promotor do gene *PGR* para a isoforma *PR-B* está hipermetilado em suas ilhas CpG, em tecidos endometrióticos de pacientes com endometriose em estágios II a IV. Este fato é concomitante com a redução da expressão do *PR-B*, sugerindo então uma regulação epigenética na expressão e silenciamento da isoforma *PR-B* [49]

OBJETIVO

Avaliar o padrão de metilação do receptor de progesterona das isoformas A (PR-A) e B (PR-B) do gene (*PGR*) em tecido endometrial eutópico de pacientes com infertilidade relacionada à endometriose durante a fase secretora de seu ciclo menstrual comparado ao tecido endometrial eutópico de mulheres inférteis sem endometriose na mesma fase do ciclo.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo caso controle comparativo de pacientes inférteis com endometriose comparadas a mulheres controles inférteis sem endometriose. Foram

incluídas pacientes que preencheram os critérios de inclusão preestabelecidos e consentiram em participar do estudo após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, aplicado na sala de espera do Centro Cirúrgico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP).

Foram avaliadas 23 pacientes, divididas em dois grupos: Controle infértil (12 pacientes) e endometriose (11 pacientes). Amostras endometriais de todas as pacientes foram obtidas com uso de cureta de Pipelle, após a realização da como parte da propedêutica da infertilidade conjugal (controle infértil e infertilidade relacionada à endometriose), de acordo com os protocolos assistenciais do Setor de Reprodução Humana-DGO-FMRP-USP.

O estudo foi realizado junto ao Laboratório de Ginecologia - Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FMRP-USP e Laboratório de Biologia da Reprodução do Multiusuário – FMRP-USP.

Foram incluídas para o grupo controle infértil mulheres com infertilidade por fator masculino e/ou tubário, ciclos menstruais regulares, submetidas à laparoscopia diagnóstica, excluindo a presença de endometriose, doença inflamatória pélvica e outras anormalidades pélvicas, e idade entre 18 e 45 anos.

No grupo endometriose, mulheres com infertilidade relacionada à endometriose sem outros fatores de infertilidade, diagnosticada com qualquer estágio da doença durante a videolaparoscopia diagnóstica, segundo os critérios definidos pela *American Society for Reproductive Medicine* (1997), que classifica a doença em quatro estágios: mínima (estádio I), leve (estádio II), moderada (estádio III) e grave (estádio IV); ciclos menstruais regulares e idade entre 18 e 45 anos.

Foram critérios de exclusão Obesidade, definida pelo índice de massa corporal (IMC) maior ou igual a 30 Kg/m²; presença de doenças sistêmicas tais como: *Diabetes mellitus* ou outras endocrinopatias, doença cardiovascular, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças reumatológicas; infecção pelo vírus HIV ou qualquer infecção ativa; tabagismo, alcoolismo ou drogadição; uso de medicações hormonais e de antiinflamatórios hormonais e não-hormonais nos três meses anteriores à inclusão no estudo.

Coleta e processamento do material:

Foram revisados os prontuários das pacientes que buscaram os serviços de reprodução humana do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto onde foram selecionadas as pacientes que previamente foram submetidas à videolaparoscopia diagnóstica a menos de 2 anos ou laqueadura tubária, que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão e possuíam ciclos menstruais normais (intervalos de 24 a 32 dias $\pm$ 3 dias; 2 a 7 dias de duração e fluxo de até 80 mL por ciclo). A biópsia endometrial foi realizada ambulatoriamente por médico experiente em data agendada conforme o ciclo individual de cada paciente coincidindo com a fase secretora de seus ciclos menstruais (do 15º ao 26º dia do ciclo). Para a confirmação de que a biópsia endometrial foi realizada no período secretor, todas as amostras foram submetidas à análise histológica clássica com coloração hematoxilina-eosina (HE) e a determinação da fase secretora do ciclo menstrual foi adequada de acordo com o resultado da datação endometrial, segundo os critérios de Noyes (Noyes et al., 1975), realizada por um patologista, considerado o intervalo de 28 dias como o de um ciclo menstrual ideal. Imediatamente após a coleta, as amostras de endométrio foram armazenadas a -80C° imersas em PBS.

Extração do DNA e Eletroforese:

A extração de DNA foi realizada utilizando o *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, 51304). Pedacos de ate 25mg de cada amostra de endométrio foram cortados e acrescidos de proteinase K e seu *buffer*, posteriormente colocados em banho-maria a 56°C até que o tecido estivesse totalmente digerido. O material foi transferido para coluna e centrifugado, com isso o DNA se aderiu à membrana da mesma. Sucessivas lavagens foram feitas com as soluções apresentadas pelo kit para purificação do DNA extraído e ao final foi realizada a eluição do material genômico aderido à membrana com água aquecida a 56°C. O DNA extraído foi mantido congelado a -20°C. O DNA extraído foi então avaliado pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 2% para avaliar sua integridade.

Modificação por Bissulfito de Sódio:

A seguinte etapa foi a modificação do material genômico pela técnica do bissulfito de sódio. Esta modificação permite a conversão *in vitro* das citosinas não metiladas presentes na molécula de DNA em uracilas para assim ser possível a análise do padrão de metilação pela presença das citosinas metiladas que permaneceram no DNA após a modificação. Para tanto foi utilizado o *EpiTec Bissulfite Kit* (Qiagen, Hilden Germany). Conforme especificações do fabricante 1,5 µg de DNA de cada amostra foram utilizados para a modificação, acrescidos de *bissulfite mix* e *protect buffer*, oferecidos pelo fabricante, em tubos para PCR. A mistura foi levada ao termociclador segundo especificações do kit onde se dá a modificação do DNA. Ao término da ciclagem o material presente nos tubos foi levado para colunas onde o DNA, agora já modificado, se prende à membrana presente na coluna e através de sucessivas

centrifugações e lavagens, com *buffers* oferecidos pelo kit purificando o DNA. A eluição do material aderido á membrana foi realizada finalmente com o *buffer* de eluição fornecido pelo fabricante. O DNA modificado foi estocado á -20° C°.

High Resolution Melting (HRM):

Após a modificação por bissulfito, foi empregada a técnica de High Resolution Melting (HRM) onde a princípio o DNA passa por amplificação através de PCR Real Time. Nesta amplificação, as uracilas presentes na molécula de DNA modificado são copiadas nos novos fragmentos como timina, portanto onde inicialmente no DNA genômico encontrávamos uma citosina, base nitrogenada pirimídica, passamos a encontrar uma timina, base nitrogenada purica.

Logo em seguida este produto de PCR recém sintetizado passa por um aumento sucessivo e gradual de temperatura até 95 °C para se observar o ponto de dissociação da dupla fita dos fragmentos. A temperatura em que ocorre essa dissociação é chamada de ponto de *melting* e através dela podemos estimar o grau de metilação do DNA. A porcentagem de metilação é estimada na temperatura de dissociação pois, quanto maior o número de timinas, mais fácil se dará sua dissociação pois se tratando de uma base púrica realiza somente 2 ligações de hidrogênio no pareamento com a base da fita homologa de DNA. Ou seja quanto mais timinas encontramos no fragmento de DNA, mais baixo seu ponto de dissociação. Em contrapartida, quanto mais citosinas, mais tarde se dará sua dissociação, já que esta sendo uma base pirimídica realiza 3 ligações de hidrogênio, o que torna a fita de DNA mais estável em relação a uma fita rica em timinas e pobre em citosinas [57].

Para esta técnica foram utilizados 2,5 µl de DNA modificado pelo tratamento de bissulfito de sódio de cada uma das amostras, 10 µl de *MeltDoctor* (Applied Biosystems) e 1 µl de cada oligonucleotídeos iniciadores (Primers). Os Primers aqui utilizados foram baseados nos já descritos por Wu et al.[49] que se anelam nas regiões em que se encontram os promotores das isoformas. Junto às amostras, na mesma placa, foi acrescentada uma curva de referência com controles já conhecidos por estarem 0%, 20%, 50%, 80% e 100% metilados, pertencentes ao kit PCR control DNA Set (Quiagen). A placa contendo todas as amostras e a curva de referência foi levada ao termociclador 9500 FAST onde ocorre a amplificação do DNA modificado e a leitura do seu ponto de *melting*.

Análise dos Resultados Obtidos por HRM e Análise estatística

Os dados obtidos pelo HRM foram lidos pelo programa HRM Software que nos mostra a porcentagem de metilação encontrada em cada amostra. Para comparação das porcentagens de metilação das isoformas PR-A e PR-B dos grupos amostrais foi realizado o teste exato de Fisher.

Dosagem sérica de progesterona:

No momento de cada coleta de endométrio, foi também coletado sangue de cada uma das pacientes para dosagem sérica do nível de progesterona, afim de se confirmar a ovulação, confirmando assim que as coletas foram realizadas na fase secretora do ciclo menstrual (progesterona ≥ 3 ng/ml). A dosagem foi realizada por quimiluminescência com o kit IMMULITE 2000 (Siemens).

RESULTADOS

Após a extração do DNA e validação de sua integridade em eletroforese, a modificação por bissulfito de sódio foi realizada como descrito na metodologia e em seguida foi realizada a técnica HRM (*High Resolution Melting*) onde foi avaliada, em relação a uma curva padrão, a porcentagem de metilação das isoformas A e B de cada amostra. O observado no HRM foi submetido á análise estatística através do teste exato de Fisher e esta disposto na Tabela 1

Tabela 1. Teste exato de Fisher para avaliação estatística da comparação das porcentagens aproximadas de metilação da isoforma PR-B entre pacientes inférteis com e sem endometriose

% aproximada de Metilação (PR-B)	Controle Infértil	Endometriose	Total
0 - 20%	7	2	9
	77,8%	20,0%	
50%	2	7	9
	22,2%	70,0%	
80%	0	1	1
	0,0%	10,0%	
Total	9	10	19
Valor p	0,04		

A análise estatística nos permite verificar uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. Confrontando os dados observamos que no grupo Controle Infértil a prevalência de pacientes com porcentagem entre 0-20% de metilação é de 77,8% comparando-se com o grupo Endometriose, enquanto que no grupo Endometriose a

prevalência de porcentagem de metilação de 50% é de 70% em relação ao grupo Controle Infértil.

DISCUSSÃO

Como visto anteriormente a baixa contagem de receptores de progesterona pode ser o elo de ligação entre infertilidade e endometriose e para tanto nos propomos a estudar o perfil epigenético dos promotores do gene que sintetizam tais receptores (isoformas PR-A e PR-B), visando a metilação deste gene.

A isoforma PR-A do gene PGR atua como modulador transcrição da isoforma PR-B além de outros hormônios esteroides [54]. Em nosso grupo de estudo o gene que expressa esta proteína não mostrou sinais de metilação em seu promotor, sugerindo não haver alterações na sua expressão quando empregada a técnica de HRM. No estudo de Wu, Y., et al.[49] foi realizada a técnica de Methylation Specific PCR (MSP), que analisa a metilação do DNA através de uma PCR sensível a metilação, em células epiteliais de focos endometrióticos. Neste estudo a isoforma PR-A também não mostrou sinais de metilação revelando possivelmente que na endometriose não há interferência quanto á metilação na expressão da isoforma PR-A.

A isoforma PR-B, ativador transcricional dominante dos promotores sensíveis à progesterona, contudo mostrou-se parcialmente metilada nas pacientes inférteis com endometriose com 70% do grupo com 50% de metilação no promotor gene. No grupo controle infértil a metilação apresentou-se em 0-20% do promotor do gene em 77,8% das pacientes contidas neste grupo. Já é sabido que a metilação do promotor leva á depressão da expressão ou até ao silenciamento total do gene[59]. Como o grupo

controle é constituído por pacientes inférteis sem endometriose podemos sugerir que o aumento da metilação pode ser atribuído á presença da endometriose. O estudo de Wu, Y., et al.[49] utilizou a técnica MSP também para avaliar a metilação da isoforma PR-B nas mesmas amostras de células epiteliais de focos endometrióticos. Foi encontrado que a isoforma apresentava bandas de DNA metiladas e não metiladas sugerindo fortemente que a região promotora da PR-B tem uma tendência á estar parcialmente metilada na endometriose, resultado confirmado através de sequenciamento e que vai de encontro com o que observamos em nosso estudo.

O trabalho de Da Broi, M.G., et al [60] avaliou ultraestruturalmente o endométrio eutópico de pacientes inférteis com e sem endometriose mínima/leve durante a janela de implantação no mesmo grupo de pacientes aqui analisado. O foco deste estudo foi avaliar a presença e o desenvolvimento de pinopodes, estruturas epiteliais responsáveis pela implantação[61]. O desenvolvimento destas estruturas esta associado à concentração de progesterona e a seus receptores[61].

Foi constatado neste estudo o predomínio de pinopodes regredindo e menor porcentagem de pinopodes desenvolvidos e em desenvolvimento em pacientes inférteis com endometriose comparadas a um grupo controle infértil porém sem endometriose. Isto sugere uma assincronia na expressão destas estruturas em pacientes inférteis com endometriose e consequente interferência na implantação e fertilidade desta pacientes[60].

Uma vez que o desenvolvimento dos pinopodes esta vinculado à atuação da progesterona através de seus receptores, podemos observar um paralelo interessante entre o aumento da metilação da isoforma PR-B, receptor dominante na atuação da

progesterona no interior da célula [54], e o declínio da presença e desenvolvimento de pinopodes no endométrio eutópico de pacientes inférteis com endometriose[60].

A alteração no desenvolvimento de pinopodes num grupo com amostras idênticas ao abordado neste estudo corrobora a idéia de que a metilação parcial do promotor da isoforma PR-B foi suficiente para interferir em sua expressão, acarretando em uma resposta que afetou diretamente a implantação embrionária (alterações dos pinopodes) e consequentemente a fertilidade da paciente.

Para conclusões mais precisas, futuros estudos sobre a expressão do gene PGR, em especial da isoforma PR-B, em pacientes inférteis com endometriose seria importante. Contudo os dados aqui mostrados nos permitem sugerir que há uma importante relação entre a metilação da região promotora da isoforma PR-B em pacientes inférteis com endometriose e a fertilidade destas pacientes levando a crer que a endometriose possa mesmo ser uma doença causada por fatores epigenéticos e que a metilação parcial na região promotora do gene PGR isoforma PR-B foi suficiente para causar alterações na expressão de sua proteína.

CONCLUSÃO

Concluimos que o promotor do gene que expressa o receptor de progesterona (isoforma PR-B) encontra-se parcialmente metilado em pacientes inférteis com endometriose. A metilação parcial deste promotor foi suficiente para causar alterações na expressão deste gene que influenciaram diretamente a resposta das células à progesterona e consequentemente impactando a implantação embrionária e a fertilidade destas pacientes.