UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

IVAN ANDRADE DE ARAUJO PENNA

**Regulação da *CALPAIN5* pelo *HOXA10* em células endometriais e decídua e sua
expressão genética aberrante na endometriose e na pré-eclampsia**

Ribeirão Preto

2008

IVAN ANDRADE DE ARAUJO PENNA

**Regulação da *CALPAIN5* pelo *HOXA10* em células endometriais e decídua e sua
expressão genética aberrante na endometriose e na pré-eclampsia**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação de Ginecologia e Obstetrícia
da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani

Ribeirão Preto

2008

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.

Catálogo na Publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Penna, Ivan Araujo

Regulação da *CALPAIN5* pelo *HOXA10* em células endometriais e decídua e sua expressão genética aberrante na endometriose e na pré-eclampsia./ Ivan Andrade de Araújo Penna; Orientador: Rui Alberto Ferriani. – Ribeirão Preto, 2008.

101.f.:fig

Tese (Doutorado- Programa de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia)

Orientador: Ferriani, Rui Alberto

1.*CALPAIN5*. 2.*HOXA10*. 3.Endometriose. 4.Pré-eclampsia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ivan Andrade de Araújo Penna

Regulação da *CALPAIN5* pelo *HOXA10* em células endometriais e decídua e sua expressão genética aberrante na endometriose e na pré-eclampsia.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIAS

Dedico esse trabalho cheio de sofrimentos, aventuras, provações e felicidades ao amor da minha vida e minha companheira, **Maria**.

Assim como aos **meus pais**, que sempre me incentivaram e apoiaram, colocando-se muitas vezes em segundo plano. Amo vocês.

Aos meus irmãos **Pedro, Lucas e André** que esse pequeno gesto incentive-os a perseverar sempre.

Aos meus avós **Rubens Morais de Andrade e Pedro Baptista de Araujo Penna**, muitas saudades.

Ao **Clube da Placenta**, bastião do pensamento ideológico da ginecologia nacional e local de amizades fraternais.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, luz que ilumina minha vida e meus caminhos. Força que me dá a determinação necessária a segui-los, amor que me torna paciente e vida que alegra o dia a dia.

Ao **Prof. Paulo Roberto Bastos Canella**, meu mestre, grande amigo e grande incentivador da minha curiosidade científica.

Ao **Prof. Rui Alberto Ferriani** meu orientador e mais amigo, pelo apoio total e irrestrito, na realização desse sonho.

Ao **Prof. Hugh Taylor** que me acolheu como um irmão mais novo, durante minha estada na Universidade de Yale.

Ao **Prof.Dr. Hugo Miyahira**, pela amizade, apoio e incentivo na realização desse trabalho e na vida acadêmica.

Ao meu avô **Dr. Pedro Batista de Araujo Penna**, pelos grandes ensinamentos no curto período de convivência. Muitas saudades, vô.

As minhas avós **Maura e Chica** pelo amor, alegria e preces.

Aos meus sogros, **Aloisio e Cristina** pelo apoio inestimável na minha vida acadêmica e profissional.

A **Mauricinho**, minha eterna gratidão no apoio a esse trabalho.

Aos amigos do laboratório do Prof. Hugh Taylor pelo apoio e ensinamentos: Amy, Anne, Hongling, Vaang, Erin, Daniella, Pinar, Beth, Kuba, Stocco, Umit, Swachtz, Jason, Pasquale e todos os outros. Sempre irão viver na minha memória.

A todos do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e do Laboratório de Ginecologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial: Profa. Rosana Maria dos Reis, Prof. Marcos Dias Moura, Prof. Dr. Marcos Filipe Silva de Sá, Prof. Dr. Geraldo Duarte, assim como aos amigos: Albina, Ilza, Renata, Sandra, Auxiliadora, Paula, Carol, Ana Carolina, Salata, Julio, Omero, Rodrigo, Luciana, Elaine, Vanessa, Janaina, Daniel, Mali e todos os outros pós-graduandos. Em especial a Rosane que muitas vezes tornou o impossível em possível.

A todos do Instituto de Ginecologia da UFRJ (Hospital Moncorvo Filho) que sempre me apoiaram e lutaram pelo sucesso. Aos professores: Profa. Maria do Carmo, Profa. Maria Antônia, Prof. Jacir, Prof. Gutemberg, Prof. Jose Augusto Em especial: Paula Muller, Ricardo, Rosana, Sandra e Vera.

A CAPES pelo apoio financeiro para realização dessa pesquisa e pela oportunidade da realização da bolsa sanduíche.

RESUMO

Penna, I.A.A. **Regulação da *CALPAIN5* pelo *HOXA10* em células endometriais e decídua e sua expressão genética aberrante na endometriose e na pré-eclampsia.** 2008. 101f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Introdução: A *CALPAIN5* faz parte da família das cisteínas proteases e está relacionada com a regulação de inúmeras funções celulares, entre elas a diferenciação e a apoptose. Estudos com *microarrays* identificaram a *CALPAIN5* como um alvo da ação transcricional do *HOXA10* em úteros de camundongos. **Objetivos:** No presente estudo avaliou-se a regulação da *CALPAIN5* pelo *HOXA10* em células endometriais, a expressão da *CALPAIN5* no endométrio durante todo o ciclo menstrual, e na decídua do primeiro e terceiro trimestres de gestações normais, e o padrão de expressão anormal desse gene na pré-eclampsia e endometriose. **Material e Métodos:** Foram obtidas dez biópsias endometriais (cinco na fase proliferativa e cinco na fase secretora) de pacientes férteis. Biópsias de lesões de endometriose, confirmadas por histopatologia, foram retiradas de dez mulheres durante procedimento vídeo-laparoscópico. Amostras de decídua foram coletadas em três diferentes ocasiões: três amostras do primeiro trimestre, cinco amostras no terceiro trimestre e cinco amostras de pacientes com pré-eclampsia no terceiro trimestre. Identificou-se a proteína da *CALPAIN5* utilizando imunohistoquímica (IHC) no endométrio eutópico, ectópico e na decídua. Os resultados da IHC foram quantificados, a partir de dois diferentes observadores, utilizando-se *Hscore* para células estromais, epiteliais e deciduais. Transfeccionou-se 4,0µg de pcDNA/*HOXA10* e 20µM siRNA/*HOXA10* em cultura de células estromais endometriais humanas (HESC) e células epiteliais endometriais humanas (Ishikawa), assim como os seus respectivos controles. A transfecção foi realizada em quadruplicata quando a cultura de células apresentava confluência de 60-70%. Após 48 horas do procedimento o RNA foi extraído, que deu origem a DNA complementar e após uma reação de cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) foi realizada, em triplicata, para determinar o padrão de expressão do *HOXA10* e *CALPAIN5*. A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes ANOVA com *test pos-hoc* para o *Hscore* e teste *t* para os resultados da PCR em tempo real. **Resultados:** *CALPAIN5* é expressa durante todo o ciclo menstrual tanto nas células estromais como epiteliais glandulares, e está mais expressa na decídua do primeiro trimestre. Na endometriose *CALPAIN5* se mostrou pouco evidente em ambas as células endometriais (estromais e glandulares), quando comparadas de forma geral com as células endometriais eutópicas das pacientes controles, sendo que sua expressão reduziu em 50% ($p<0,05$). Nas decíduas de pacientes com pré-eclampsia *CALPAIN5* apresentou-se mais expressa que no grupo controle ($p<0,05$). Nas células estromais endometriais o pcDNA/*HOXA10* aumentou a expressão da *CALPAIN5* em 11 vezes ($p<0,05$) e a transfecção com siRNA/*HOXA10* reduziu a expressão da *CALPAIN5* em 23 vezes ($p<0,05$).

Conclusão: O *HOXA10* regula a expressão genética da *CALPAIN5* nas células endometriais. *CALPAIN5* é expressa no endométrio normal e tem sua expressão aumentada nas células deciduais do primeiro trimestre em relação às fases do ciclo menstrual. *CALPAIN5* está pouco expressa no endométrio ectópico na endometriose e mais expressa nas células deciduais na pré-eclampsia grave quando comparados com seus respectivos controles.

UNITERMOS: Endométrio, *CALPAIN5*, *HOXA10*, endometriose, pré-eclampsia.

ABSTRACT

Penna, I.A.A. ***CALPAIN5* expression is regulated by *HOXA10* in human endometrial cells and deciduas; aberrant regulation in endometriosis and pre-eclampsia.** 2008.101 f. Thesis (PhD's degree) - University of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

BACKGROUND: *CALPAIN5* is member of the calpain-like cystein protease family and has been implicated in the regulation of a variety of cellular functions, including differentiation and apoptosis. Research with microarray screen identified *CALPAIN5* as target of *HOXA10* transcriptional control in murine endometrium. **OBJECTIVES:** We propose in this study to demonstrate regulated *CALPAIN5* expression in endometrium, and 3rd trimester deciduas and an abnormal expression pattern of this gene in pre eclampsia and endometriosis . **MATERIALS & METHODS:** Ten endometrial biopsies (5 proliferative phase and 5 secretory phase) were obtained from fertile controls. Histologically confirmed biopsies of endometriosis were obtained from 10 women at the time of laparoscopy. Five third trimester decidual samples and 3 first trimester deciduas samples from controls, and five 3rd trimester decidual samples from women with pre-eclampsia were obtained at the time of labor. Immunohistochemistry (IHC) was used to identify *CALPAIN5* protein in eutopic and ectopic endometrium as well as in decidua. IHC was performed with *CALPAIN5* polyclonal antibody. IHC results were assessed by 2 evaluators blinded to the study groups, and H-SCORES were determined for the stroma, glands and decidua. The human endometrial stromal cell line, HESC, the human endometrial epithelial cell line, Ishikawa were transfected with either 4.0µg pcDNA/*HOXA10* or 20µM *HOXA10* siRNA; transfection with empty pcDNA vector or nonspecific siRNA served as respective controls. Cells were transfected in quadruplicate at 60-70% confluence. Forty eight hours after the transfection total RNA was isolated. qRT-PCR was performed in duplicated to determine expression levels of *HOXA10* and *CALPAIN5* in each group. Statistical analysis was performed with ANOVA *test pos-hoc* to *Hscore* and *t* test for real time PCR **RESULTS:** *CALPAIN5* was expressed in endometrial stromal and glandular cells throughout the menstrual cycle, and increased expression was noted in the first trimester decidua phase. There was a decrease in *CALPAIN5* expression in both stromal and glandular cells in endometriosis to 50% of that seen in fertile controls ($p<0.05$). *CALPAIN 5* was also expressed in 3rd trimester decidua obtained from pre-eclampsia at higher levels than 3rd trimester control decidua ($p<0.05$). The regulatory relationship between *HOXA10* and *CALPAIN5* was established by transient transfection analysis. *CALPAIN5* gene expression increased 11-fold ($p<0.05$) after pcDNA/*HOXA10* transfection of the HESC, and decreased 23-fold ($p<0.05$) after *HOXA10* siRNA treatment. **CONCLUSIONS:** *CALPAIN5* expression is regulated by *HOXA10*. *CALPAIN5* is expressed in normal endometrium and at upregulated in the decidua of women with pre-eclampsia. *CALPAIN5* expression is decreased in endometriosis compared to eutopic endometrium.

Key-words: Endometrium, *CALPAIN5*, *HOXA10*, endometriosis and pre- eclampsia

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Imunohistoquímica da proteína citoplasmática CALPAIN5: A) Endométrio controle; B) Endométrio proliferativo; C) Endométrio secretor; D) Decídua do primeiro trimestre; E) Endométrio ectópico de pacientes portadoras de endometriose; F) Decídua do terceiro trimestre de pacientes com gestação normal; G) Decídua do terceiro trimestre de pacientes com pré-eclampsia.....	33
Figura 2- Expressão da CALPAIN5 nas glândulas e estroma do endométrio proliferativo e secretor, avaliado pelo <i>Hscore</i>	34
Figura 3a- Comparação entre a expressão da CALPAIN5 na decídua de primeiro trimestre e endométrio secretor através da análise do <i>Hscore</i>	34
Figura 3b-Comparação entre a expressão da CALPAIN5 na decídua de primeiro trimestre e decídua do terceiro trimestre através da análise do <i>Hscore</i>	35
Figura 4- Resultados da transfecção com pcDNA/ <i>HOXA10</i> e siRNA/ <i>HOXA10</i> em células endometriais estromais humanas. Resultados mostram a expressão relativa do RNA de <i>HOXA10</i> e <i>CALPAIN5</i>	36
Figura 5- Expressão da CALPAIN5 no endométrio tópico de pacientes do grupo controle e no endométrio ectópico de pacientes com endometriose.	37
Figura 6- Comparação entre a expressão citoplasmática da CALPAIN5 em decídua do terceiro trimestre de pacientes com pré-clâmpsia e pacientes controles.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA-	DNA complementar
DA –	Doença de Alzheimer
DICER-	Enzima de degradação do RNA
DH-	Doença de Huntington
DP-	Doença de Parkinson
dsRNA-	RNA de dupla cadeia
HAM-	Meio de cultura modificado
HESC-	Células estromais endometriais humanas
IAF-	Fator indutor da apoptose
MEM-	Meio de cultura essencial
miRNA-	micro RNA
pcDNA 3.1 (+)-	Plasmídio
pcDNA/ <i>antisense HOXA10</i> -	Plasmídio contendo o <i>antisense</i> do <i>HOXA10</i>
pcDNA/ <i>HOXA10</i> -	Plasmídio contendo DNA complementar <i>HOXA10</i>
PCR em tempo real (qRT-PCR)-	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RISC-	RNA interference specificity complex
RNA _m -	RNA mensageiro
shRNA-	<i>short hairpin</i> RNA
siRNA-	RNA pequeno de interferência
SOP-	Síndrome dos ovários policísticos

SUMÁRIO

1 - RESUMO	vii
2 - ABSTRACT	viii
3 - INTRODUÇÃO	1
3.1-Calpaínas	2
3.1.1 - Calpaínas clássicas	2
3.1.2 - Calpaínas típicas.....	3
3.1.3 - Calpaínas atípicas.....	4
3.1.4- Ativação	4
3.1.5- Calpaínas e apoptose	5
3.2-CALPAIN5.....	6
3.3- <i>HOX</i> e <i>HOXA10</i>	7
3.4- Endometriose.....	8
3.4.1- Etiopatogenia.....	9
3.4.2- Endometriose e infertilidade	10
3.5- Pré-eclampsia	11
3.5.1- Diagnóstico	11
3.5.2- Etiopatogenia.....	12
3.6- Biologia Molecular.....	13
3.6.1- RNA curto de interferência	15
3.6.2- Princípios da transfecção genética	18
4 - JUSTIFICATIVA.....	21
5 - OBJETIVOS.....	23

6 - MATERIAIS e MÉTODOS	25
6.1- Pacientes.....	26
6.2- Preparação de plasmídios e siRNA	27
6.3- Cultura celular	27
6.4- Transfecção genética em células humanas.....	27
6.5- PCR em tempo real	28
6.6- Técnica de imunohistoquímica.....	29
6.7- <i>Hscore</i>	30
6.8- Análise estatística.....	30
7 - RESULTADOS.....	31
7.1- Expressão da CALPAIN5 no endométrio e na decídua	32
7.2- Expressão das CALPAIN5 na decídua	32
7.3- A expressão da <i>CALPAIN5</i> e sua regulação pelo <i>HOXA10</i>	35
7.4- A expressão da CALPAIN5 na endometriose e na pré-eclampsia.....	36
8 - DISCUSSÃO	38
9 - CONCLUSÃO	44
10 - PERSPECTIVAS.....	46
11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
12 - MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO	58
13 - ANEXOS	86

3.1- Calpaínas

As calpaínas são cisteínas proteases (enzimas proteolíticas com cisteínas no sítio catalítico) localizadas no citoplasma e moduladoras de diversas funções celulares. Em humanos, quatorze diferentes genes codificam os membros desta superfamília. Suas funções celulares são parcialmente conhecidas, destacando-se a diferenciação celular, apoptose e fusão de membrana citoplasmática (SUZUKI *et al.*, 2004).

As calpaínas podem ser específicas de determinados tecidos e estarem ligadas a doenças tais como *Diabetes mellitus*, catarata, esclerose múltipla, distrofia muscular do tipo 2A, distrofia muscular de Duchenne e doença de Alzheimer, (a exemplo das calpaínas 3, 6, 8, 9, 11 e 12), ou serem expressas de forma generalizada nos tecidos humanos, como as calpaínas 1, 2, 5, 7, 10, 13 e 15 (SUZUKI *et al.*, 2004).

No estudo destas cisteínas proteases, distinguem-se as calpaínas: clássicas, as típicas e as atípicas.

3.1.1 - Calpaínas clássicas

Os dois membros mais estudados e também conhecidos como calpaínas clássicas são a μ -calpaína codificado pelo gene *CALPAIN1*, e a m-calpaína codificado pelo gene *CALPAIN2*. Essas duas enzimas diferem na forma espacial e nas concentrações de Ca^{2+} necessárias para sua ativação, na ordem de micromolar para μ -calpaína e milimolar para a m-calpaína (GOLL *et al.*, 2003).

As calpaínas clássicas foram extensamente estudadas em várias doenças. Na doença de Alzheimer ambas μ -calpaína e m-calpaína estão envolvidas no processo molecular de hiperfosforilação da tau (a principal proteína observada nos cérebros dos pacientes que sofrem dessa doença (HIGUCHI *et al.*, 2005). Na doença de Huntington, as calpaínas clássicas

associadas à proteossomas e caspases clivam a proteína huntingtina (htt) em vários sítios, gerando fragmentos tóxicos capazes de provocar lesão da neuroglia.

Na doença de Parkinson (DP), a m-calpaína está expressa de forma aberrante e ao promover clivagem da mielina, degrada, por dismielização o componente principal do Corpo de Lewis ocasionado sintomas extra-piramidais (MOUATT-PRIGENT *et al.*, 1996; RAY *et al.*, 2003).

O aumento da atividade das calpaínas clássicas também foi observado nas doenças neuromusculares de Duchenne e Becker. Essa atividade alterada relaciona-se ao aumento dos íons de Ca^{2+} , causados pela ausência da proteína distrofina, característica dessa doença. A ativação dessas calpaínas causa degradação de proteínas miofibrilares essenciais para atividade muscular (GOLL *et al.* 2003).

A μ -calpaína e a m-calpaína, também estão relacionadas à fisiopatologia de alguns tumores como câncer de mama, ovário, próstata, pele, cérebro e colo-retal. Nessas neoplasias, de comum se constata aumento das concentrações de Ca^{2+} . Tal concentração ao promover a ativação anômala de ambas calpaínas, ocasiona a proteólise da p53, supressor neoplásico nuclear (GOLL *et al.* 2003). Adicionalmente, a μ -calpaína e a m-calpaína mediam a ativação do fator nuclear $\kappa\beta$, envolvido no processo de proliferação celular (LEE *et al.*, 2005).

3.1.2- Calpaínas típicas

As calpaínas típicas (3, 8, 9, 11, 12 e 13) são assim referidas pela presença de domínio específico, chamado *penta-EF-hand*. A CALPAIN3, codificada pelo gene homônimo, está relacionada com a distrofia muscular do tipo 2A, que se manifesta por atrofia muscular simétrica e fraqueza. A CALPAIN8, codificada pelo gene *CALPAIN8*, é encontrada apenas na musculatura lisa do estômago e até o presente momento não está associada a nenhuma

doença. A CALPAIN9 está restrita ao aparelho digestivo onde se observa sua atividade reduzida no câncer gástrico. Estudos experimentais em camundongos associam a CALPAIN12 com a doença de Alzheimer. As calpaínas 11 e 13 não estão associadas a doenças e ambas estão expressas apenas no testículo (SAEZ *et al.*, 2006).

3.1.3- Calpaínas atípicas

Os membros da subfamília de calpaínas atípicas (5, 6, 7, 10 e 15) não apresentam o domínio específico *penta-EF-hand* em sua estrutura. A CALPAIN15 é expressa em pequenas quantidades em todo o corpo exceto pulmão e testículos, onde sua atividade está aumentada. Entretanto essa protease parece estar relacionada na etiopatogenia de doenças oculares tais como microftalmia e catarata hereditária (YOKOYAMA *et al.*, 1992).

A CALPAIN6 tem seu gene localizado no cromossomo X e está relacionada com a diferenciação do mioblasto. Essa calpaína foi descrita como associada à leiomiomatose uterina e a hipertrofia cardíaca (SAEZ *et al.*, 2006).

Dentre os membros da subfamília da calpaínas atípicas a CALPAIN10 é a mais estudada. Possui associação bem definida com a fisiopatologia do *Diabetes mellitus*, onde a CALPAIN10 ativa o processo de apoptose nas células betas, provocando redução na produção de insulina. Associa-se também à dislipidemia e à síndrome dos ovários policísticos (MARSHALL *et al.*, 2005; KANG *et al.*, 2006).

3.1.4- Ativação

Os mecanismos pelo qual as calpaínas são ativadas e identificam suas proteínas alvo necessitam ainda de esclarecimentos. O antagonista natural das calpaínas é a calpistatina. O complexo formado pela calpaína-calpistatina é importante como estratégia experimental na

determinação das funções dessa protease nos diversos tecidos e células (MARSHALL *et al.*, 2005).

Dada à abundância das calpaínas no citoplasma celular é necessário um mecanismo complexo de controle de sua ativação. O influxo de íons de Ca^{2+} e a localização das calpaínas em relação à membrana citoplasmática são os fatores determinantes para sua ativação. Entretanto, os detalhes desse processo não são totalmente compreendidos. Acredita-se que as calpaínas ativam-se logo que ocorre sua ligação com o substrato, independente de co-fatores e/ou catalisadores, mas dependente apenas do Ca^{2+} (ZATZ & STARLING, 2005).

3.1.5- Calpaínas e apoptose

Nos últimos anos, muito tem sido feito na tentativa de esclarecer todos os complexos processos da morte celular programada, a apoptose. Nesse sentido, as calpaínas parecem ter uma importante função nesse mecanismo. A apoptose mediada pelas caspases ocorrem por duas vias: extrínseca e intrínseca. Na primeira, ocorre a ativação da caspase-8 após a ligação com o receptor de morte celular. Na segunda, o gatilho do processo é gerado pelo citocromo “c” mitocondrial, o qual estimula a caspase-9. Ambos os processos são regulados pelas proteínas da família BCL2 (POLSTER & FISKUM, 2004).

Os membros da família da BCL2 tanto promovem como inibem o processo de apoptose e alguns desses são regulados pelas calpaínas. BCL2 e BAX são duas proteínas intracelulares, sendo que a BCL2 tem função de bloquear a apoptose, aumentando a sobrevivência da célula e a BAX tem função contra-reguladora, acelerando o processo de apoptose. O BAX sofre degradação por essas proteases formando um produto pró-apoptótico que ativa a via intrínseca das caspases. Outro fator pró-apoptótico, o BID é clivado pelas mesmas enzimas calpaínas levando a ativação da mesma via, em direção a apoptose (GAO & DOU, 2000).

O início do processo de apoptose por ação das calpaínas ocorre também pela inativação da calpastatina (inibidor da calpaína) durante o processo de morte celular (NAKAGAWA & YUAN, 2000).

As calpaínas, mais especificamente μ -calpaína, também pode induzir apoptose independente da via das caspases. Essas proteases causariam degradação de proteínas inibidoras do fator indutor da apoptose (IAF) que ativado, sairia da mitocôndria em direção ao citoplasma e o núcleo induzindo a morte celular (POLSTER *et al.*, 2005).

3.2 - CALPAIN5

A *CALPAIN5* está expressa de forma discreta em todos os tecidos do corpo e em grande quantidade no cérebro, pulmão, fígado, testículo e também nos ovários, na placenta e no sistema nervoso central (GONZALES *et al.*, 2006). Quando se analisa a estrutura da proteína *CALPAIN5* (também chamada de *Htra3*) verifica-se que esta apresenta 87% de similaridade ao RNAm para humanos e de 95% para camundongos, sendo também homóloga à *CALPAIN15* do *Caenorhabditis elegans* tra-3 – nematode - (SYNTICHAKI *et al.*, 2002). Devido a essa similaridade, os modelos de estudo em camundongos são os mais utilizados. A *CALPAIN5* parece relacionar-se também com a Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e hipertensão arterial sistêmica, não havendo mais dados sobre *CALPAIN5* nos demais tecidos do corpo em especial no sistema reprodutivo feminino (GONZALES *et al.*, 2006).

Por meio do *microarray*, recurso capaz de avaliar a expressão de diferentes genes num determinado tecido, associado à transfecção dos complexos pcDNA/*HOXA10* e pcDNA/*antisense-HOXA10* no útero de camundongo, vislumbrou-se a possibilidade de que o *CALPAIN5* seria um gene regulado pelo *HOXA10*.

3.3- *HOX* e *HOXA10*

Os genes *HOX* são responsáveis pela regulação da morfologia embriológica e diferenciação. Todas as espécies animais possuem os genes *HOX*, embora a forma de sua atuação reguladora seja variável entre elas (GRAHAM *et al.*, 1988). Existe um total de trinta e nove genes *HOX* divididos em quatro *clusters*: A, B, C, D, os quais estão localizados nos cromossomos 7, 17, 12 e 2. Cada *cluster* é composto de 9-13 genes (SATOKABA; BENSON & MAAS, 1995; LAPPIN *et al.*, 2006).

No ducto paramesonéfrico apenas o *cluster A* é expresso. O *HOXA9* está expresso e regula a morfologia na área da trompa uterina, *HOXA10* no útero, *HOXA11* no útero e de forma mais específica no colo uterino e o *HOXA13* no terço superior da vagina (TAYLOR *et al.*, 1998). Hormônios esteróides sexuais regulam a ação do gene *HOXA* no período embrionário e na vida adulta. Essa regulação foi demonstrada pela exposição *in útero* ao dietilstilbestrol, um estrogênio não esteróide que promoveu a alteração da localização de expressão dos diferentes tipos de genes *HOXA* no ducto paramesonefro, promovendo deformidades dos ductos de Muller (AKBAS; SONG & TAYLOR; 2004).

Nos indivíduos adultos, o *HOXA10* é um fator de transcrição necessário para a implantação do embrião e controle direto da remodelação endometrial. A mudança da expressão do *HOXA10* no endométrio de camundongos causa redução das taxas de implantação (SATOKABA; BENSON & MAAS, 1995). Em 2000, Taylor *et al.*, utilizando camundongos fêmeas (com expressão do *HOXA10* e desenvolvimento uterino normal), fizeram a transfeção *in útero* de *HOXA10 antisense*, inibindo a expressão genética do *HOXA10* logo após os camundongos terem copulado. Como resultado, observaram a redução das taxas de prenhez.

O *HOXA10* é expresso no endométrio humano durante todo o ciclo menstrual e sua regulação está vinculada às concentrações séricas de estradiol e progesterona. Algumas variações na expressão do *HOXA10* são observadas durante o ciclo menstrual, entre elas o aumento da atividade do *HOXA10* durante o meio da fase lútea, concomitante com a janela de implantação (TAYLOR *et al.*, 1998).

A expressão aberrante do gene *HOXA10* está associada a algumas doenças do sistema reprodutivo. Sua relação com a endometriose é bem conhecida, entretanto novos dados ainda não publicados do grupo de trabalho do Dr. Charles Lockwood também o relacionam à pré-eclâmpsia (comunicação pessoal).

3.4- Endometriose

A endometriose é caracterizada pela presença de tecido endometrial funcional (estroma e glândulas) fora do útero. Sua incidência é controversa devido ao grande número de casos não diagnosticados e devido à sua variação de acordo com a população estudada. A frequência de diagnóstico dessa doença sofre influência da idade, grau de instrução e presença de cirurgias abdomino-pélvicas. Sua maior incidência é durante o menacme, especialmente entre 30 e 45 anos, potencialmente afetando de 10 a 50% da população feminina mundial (DABROSIN *et al.*, 2002). Estratificando-se sua incidência por sintomatologia, Vigano *et al.* (2004) verificaram que mulheres com infertilidade apresentavam incidência de endometriose entre 25 a 35 % e nas que referiam sintoma de dor pélvica essa porcentagem podia variar de 39 a 59%.

As repercussões clínicas da endometriose são extremamente variáveis e dependem da gravidade da doença e o do local afetado. Em casos graves a endometriose pode invadir

tecidos de maneira profunda e produzir lesões de órgãos circunjacentes, com invasão do reto e sigmóide e vasos pélvicos calibrosos, como a artéria uterina (JANICKI *et al.*, 2002).

3.4.1- Etiopatogenia

A etiopatogenia da endometriose é controversa, havendo inúmeras teorias que tentam explicá-la. Maior destaque tem sido dado à teoria da menstruação retrógrada, postulada por Sampson (1924), na qual afirmou que as lesões endometrióticas surgiriam de aderências de tecido endometrial pós-menstrual na cavidade peritoneal e demais órgãos após influxo tubário retrógrado. Estudos mais recentes têm relacionado a endometriose à falha na homeostasia celular, com desequilíbrio nos mecanismos moleculares que controlam a proliferação e morte celular (VIGANO *et al.*, 2004).

A homeostase celular é produto de um delicado equilíbrio entre mecanismos de destruição ou degradação celular (apoptose) e de proliferação. A apoptose é um processo de morte celular programada que acontece após estímulo específico, no qual há condensação da cromatina e fragmentação do DNA, do núcleo e da célula em si, com posterior fagocitose por macrófagos (NOGUEIRA *et al.*, 2000).

O processo de morte celular programado é controlado pela proporção de BCL2 e BAX, duas proteínas intracelulares. Além dessas duas proteínas reguladoras, a apoptose pode ser regulada por meio da ativação de receptores chamados *death receptors*, ou seja, receptores de morte. Entre esses receptores, temos as proteínas do sistema *fas-fas* ligante. Ambos os mecanismos irão ativar a cascata das caspases, ou intrínseca ou extrínseca, levando a morte celular programada (NOGUEIRA *et al.*, 2000). Na endometriose, parece haver um desequilíbrio nesta homeostase, com maior proliferação celular nas lesões endometrióticas e

menor apoptose, aumentando a viabilidade das lesões e, portanto, permitindo a sobrevivência e crescimento das mesmas (BRAUN *et al.*, 2002).

3.4.2- Endometriose e infertilidade

A associação entre endometriose e infertilidade é bem estabelecida (WHEELER, 1989), entretanto, os mecanismos envolvidos não estão totalmente esclarecidos. Na literatura específica encontram-se alguns mecanismos, entre eles alteração no microambiente folicular ou no oócito, falência de implantação, disfunção ovulatória, defeitos imunológicos, hiperativação de macrófagos peritoneais, alteração nas citocinas no fluido folicular e na circulação sanguínea, síndrome do folículo luteinizado não roto, alterações no desenvolvimento embrionário precoce e apoptose celular aumentada em células da granulosa (WU & HO, 2003).

Pacientes com endometriose apresentam menores taxas de gravidez, incluindo nesse grupo pacientes submetidas a procedimentos de reprodução assistida de alta complexidade (BARNHART, DUNSMOORE & COUITFAIRS, 2002). Segundo o *Recently Reviewed Practice Committee Report* (2006), suas possíveis causas são: distorção da anatomia pélvica, alteração da função peritoneal, alterações hormonais e de funções mediadas pela célula, anormalidades ovulatórias e defeito na implantação.

Em 1999, Taylor *et al.* avaliaram a expressão do *HOXA10* no endométrio eutópico de pacientes portadoras de endometriose e determinaram que esse gene perdeu o seu padrão de expressão conseqüente a falha no aumento de sua expressão durante a janela de implantação. Por sua vez, Kim *et al.* (2004), em tecido endometriótico induzido em macacas babuínas, observaram a expressão aberrante do *HOXA10* no endométrio ectópico e eutópico associado à redução de proteínas relacionadas com a receptividade endometrial, entre elas a $\beta 3$ -integrina.

3.5- Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia é uma doença de causa desconhecida que ocorre apenas no período gravídico-puerperal e acomete múltiplos órgãos. Em linhas gerais caracteriza-se pela resposta vascular alterada ao processo de formação da placenta, levando ao aumento da resistência vascular sistêmica, aumento da agregação plaquetária, ativação do sistema de coagulação e disfunção do sistema endotelial (WORKING GROUP, 2000).

Apesar dos avanços na medicina neonatal, a incidência da pré-eclâmpsia não tem se alterado com o passar dos anos. Essa doença acomete entre 3 a 5 % das gestações, e apresenta elevadas taxas de mortalidade fetal e materna (15 a 20%). Esse efeito nefasto sobre a taxa de mortalidade materna e fetal está diretamente relacionado com a idade gestacional na época do desenvolvimento da doença, severidade, a qualidade de tratamento prestado e a associação de outras doenças (SIBAI, 2003).

Em 2005, Duckitt e Harrington determinaram os fatores de risco para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia após examinar mais de 1000 estudos sobre a doença. Segundo esses autores os fatores de risco foram: história pregressa de pré-eclâmpsia, gravidez múltipla, *Diabetes mellitus*, obesidade, idade materna acima de 40 anos, doenças renais, hipertensão arterial sistêmica, intervalo gestacional maior que dez anos e presença de anticorpos anti-fosfolipídeos.

3.5.1- Diagnóstico

Desde a descoberta da pré-eclâmpsia muitos foram os critérios adotados para seu diagnóstico, peculiaridade que dificultou o progresso investigativo dessa doença. Felizmente, a partir de 2000 criou-se um consenso para o diagnóstico da pré-eclâmpsia. Neste consenso, a pré-eclâmpsia é determinada pela presença de hipertensão associada à proteinúria. Define-se

hipertensão quando a pressão sanguínea, aferida em duas diferentes ocasiões, apresenta-se igual ou superior que 140/90 mmHg (sistólica), após 20 semanas de gestação. Associada à hipertensão está a proteinúria superior a 300mg em volume urinário de 24 horas (WORKING GROUP, 2000). A pré-eclâmpsia pode evoluir com um agravamento do sistema hemodinâmico, caracterizando a síndrome HELLP, com manifestações de elevação de enzimas hepáticas, hemólise e trombocitopenia ou com eclampsia, quando a paciente passa a apresentar convulsões (DOUGLAS & REDMAN, 1999).

3.5.2- Etiopatogenia.

A etiopatogenia da pré-eclâmpsia não está totalmente determinada. Para a gravidez prosseguir normalmente, o blastocisto precisa aderir e invadir o endométrio de forma que o sangue materno possa entrar em contato com os codilédones placentários (RED-HORSE *et al.*, 2004). As células do trofoblasto intersticial, um dos dois tipos de trofoblasto conhecidos, invade a decídua, atinge o miométrio e inicia a produção de vasodilatadores. A seguir, observa-se a destruição do endotélio das arteríolas espiraladas pelo segundo tipo de trofoblasto, o trofoblasto endovascular (LYALL, 2005). O trofoblasto endovascular invade a luz das arteríolas espiraladas uterinas, prende-se à sua parede e favorece a vaso-dilatação. Durante o segundo trimestre de gestação, as arteríolas espiraladas endometriais e miometriais que estão associadas ao trofoblasto endovascular passam a apresentar menor resistência ao fluxo sanguíneo, assim favorecendo a nutrição fetal. (LYALL, 2005).

Estudos recentes demonstraram que pacientes com pré-eclâmpsia apresentavam invasão superficial e em menor número de trofoblastos endovasculares que a mulher com gestações normais. Como consequência ao aumento da resistência ao fluxo sanguíneo ocorre

hipóxia e subsequente estresse oxidativo. Esse promove reações inflamatórias culminando no processo apoptótico (KADYROV *et al.*, 2003).

A apoptose está relacionada ao processo de má-adaptação placentária. Durante a pré-eclâmpsia várias citocinas que induzem a morte celular são produzidas na placenta. Destacam-se entre elas: interleucina 2, interferon gama e fator de necrose tumoral (SAITO & SAKAI, 2003). O complexo *fas-fas* ligante também atua no processo de ativação da apoptose na pré-eclâmpsia. Está provado que a viabilidade dos trofoblastos de pacientes com pré-eclâmpsia está reduzida devido à maior sensibilidade dessas células pela morte celular programada relacionada ao complexo *fas-fas*. O aumento dos “restos” celulares resultantes da apoptose aberrante na pré-eclâmpsia causa aumento da produção de substâncias pró-inflamatórias que mantêm o ciclo vicioso da patogênese dessa doença (NEALE *et al.*, 2003).

3.6 – Biologia molecular

Nos dias atuais dois tipos diferentes de manipulações transgênicas são utilizados: o *knockout* o *knockin*. Em linhas gerais, o *knockout* representa o bloqueio permanente de um determinado gene; o *knockin*, a introdução de uma mutação no DNA alvo. Apesar de não ser uma manipulação transgênica, o *knockdown*, que é o bloqueio da expressão genética de forma temporária, também é considerado um mecanismo de controle de expressão genética como os dois primeiros. Esquemas podem ser vistos na (MANIS, 2007).

O *knockout* foi desenvolvido por Evans, Smithies e Capecchi em meados dos anos oitenta. Nesse processo modifica-se geneticamente o cromossomo de uma célula embrionária, formando uma geração portadora do quimerismo, e a geração filha desta será homozigota da modificação genética desejada. Esse processo é possível devido a dois fatores: a capacidade de troca de seqüências de DNA específicas entre cromossomos (recombinação homóloga) e a

possibilidade de manipulação genética de células embrionárias (THOMAS, FOLGER & CAPECCHI, 1986).

Durante a reprodução, células germinativas diplóides sofrem meiose formando os gametas (haplóides). Na fecundação ocorre a formação do zigoto (diplóide) com o material genético de ambos os gametas. Para que essa união ocorra é necessária a recombinação homóloga, criando um arranjo único. O fenômeno da recombinação genética também está presente durante o reparo do DNA, onde a fita complementar serve de molde para aquela que será reparada (MANIS, 2007). A observação de que esse processo poderia ocorrer tanto em células somáticas como embrionárias criou uma nova ciência, a engenharia genética.

No *knockout*, células embrionárias de blastocisto de camundongos são infectadas com um retrovírus. Esse vírus carrega o DNA-alvo-alterado, que tem como função bloquear um determinado *exon* do gene alvo por meio da recombinação desse *exon* pela parte homóloga inativa do DNA-alvo-alterado. O embrião formado é transferido para o útero de outro camundongo fêmea, dando origem à geração quimérica. A prole dessa geração quimérica é homozigota para o gene bloqueado (THOMAS, FOLGER & CAPECCHI, 1986).

O *knockin* é uma variação da primeira técnica. Nesse processo não ocorre bloqueio do gene, mas a destruição do *exon* de interesse e a troca deste pela sequência de DNA mutante desejada. A degradação do *exon* alvo ocorre pela utilização de sequências de DNA que ativam a enzima *Cre* recombinase. O embrião formado segue o mesmo processo observado no *knockout* (DOETSCHMAN *et al.*, 1987).

O *knockdown*, diferente das duas técnicas anteriores, não é exclusivo para células embrionárias e, portanto, não é definitivo. O *knockdown* pode ser utilizado em praticamente todos os tipos de células, sendo a transfecção do seu vetor a maior dificuldade para a técnica. Esse método visa o bloqueio da expressão de um determinado gene a partir da interrupção da

atuação do RNAm. Para tanto se utiliza ou oligonucleotídeos que complementam as seqüências de RNAm do gene em questão, chamados de *antisense* (ex: *antisense/HOXA10*), ou fragmentos de RNA que interferem e clivam o RNAm – siRNA- (ex: *HOXA10/siRNA*). Esse bloqueio dura o tempo necessário para que haja a degradação do agente de *knockdown* (ex. siRNA ou *antisense*). O *knockdown*, por ser temporário, é uma importante ferramenta tanto para investigação das funções de determinados genes como para possível terapia de doenças (BRANCH, 1996).

3.6.1- RNA pequeno de interferência (siRNA)

Durante os anos oitenta, o silenciamento genético ou *knockdown* teve como principal técnica a utilização dos *antisense* DNA. Já nesse período o alvo de *knockdown* era a inativação do RNAm evitando a tradução da proteína. O *antisense*, um oligonucleotídeo de cadeia única complementar ao RNAm alvo, não apresentava bons resultados devido vários fatores, dentre eles a degradação rápida, instabilidade da ligação da molécula ao RNAm-alvo e dificuldade de introduzi-lo na célula. Por esses motivos, formas mais estáveis de bloqueio genético foram descobertas, entre elas o RNA pequeno de interferência (CASEY & GLAZER, 2001).

O RNA pequeno de interferência (siRNA) está relacionado com o bloqueio de atividade genética e ocorre de forma natural nas células. O mecanismo, hoje chamado de siRNA, foi primeiramente observado em plantas por Napoli, Jorgensen e Mol, em 1990 (NAPOLI *et al.*, 1990). Esses pesquisadores, utilizando plantas transgênicas, tentaram incrementar a pigmentação roxa da petúnia introduzindo como trans-gene uma cópia extra do gene que produz a enzima responsável pelo pigmento floral. Contrariamente ao esperado, elevado percentual das flores nasceram brancas, ou seja, a cópia extra do gene causou a

produção de RNA pequeno de interferência bloqueando o RNAm que traduzia a coloração da planta. O mecanismo de ação só foi descrito em 1998 por Fire *et al.*, quando, utilizando um RNA de dupla cadeia (dsRNA), estudaram sua atuação para o bloqueio genético no *Caenorhabditis elegans*.

Varias condições patológicas podem levar a uma expressão genética aberrante, causando alterações de sinais de transdução, proliferação celular e apoptose. De forma fisiológica o siRNA, presente na célula, age como um regulador dessa expressão aberrante, na medida que cliva e inativa o RNAm produzido pela doença ou vírus (AIGNER, 2007).

O mecanismo de bloqueio da expressão genética pelo siRNA pode ser iniciado por três diferentes moléculas. Por meio da molécula de *short hairpin RNA* (shRNA), pela molécula de RNA dupla cadeia (dsRNA), ou ainda pela molécula de siRNA (LEE *et al.*, 2002).

A shRNA é produzida de forma endógena ou transfeccionada para célula e núcleo por meio de um plasmídio ou vírus. O shRNA é o método fisiológico utilizado pelas células para combater infecções por vírus e mutações genéticas. Essa molécula possui uma área estrutural chamada *hairpin* unindo as duplas cadeias de RNA e conferindo a essa estrutura a forma de *looping*. Uma vez transcrito pelo DNA da célula, o shRNA sofre ação da enzima Dicer, formando uma molécula menor chamada micro RNA (miRNA). O miRNA, uma forma de RNA pequeno de interferência, é incorporado ao complexo ribossomo-miRNA e inibe a tradução do RNAm alvo (LEE *et al.*, 2002).

O dsRNA e o siRNA possuem as mesmas vias de ativação. Após ser introduzido, o RNA de dupla fita é clivado pela enzima Dicer. Essa enzima é homóloga à RNase II da *E. coli* e possui sítios de ligação para dsRNA, shRNA e sitio de helicase. A helicase é responsável pela abertura da dupla fita, conforme esquema na (AIGNER, 2007).

A atuação da Dicer sobre o dsRNA leva a formação do siRNA ou RNA pequenos de interferência. O siRNA também podem ser transfectado, introduzidos nas células, sem a necessidade do uso da pré-forma dsRNA (AIGNER, 2007).

Os RNAs pequenos de interferência são formados por uma dupla fita e seu tamanho está em torno de 23-25 pares de base. Da dupla fita, uma é a cópia da sequência alvo, também chamado de *sense* e a outra é a sequência complementar ao RNAm alvo, também chamado de *antisense*.. O siRNA liga-se a um complexo multimérico chamado RISC (*RNA interference Specificity Complex*). O RISC possui uma enzima helicase que abre a dupla fita. A fita *sense* do RNAm alvo é descartada e a *antisense* serve de guia para que o complexo RISC-siRNA encontre o RNAm desejado. Tendo sido acoplado o RNAm alvo ao complexo RISC, uma endorribonuclease chamada Argonata 2, cliva o RNAm na altura do 10°. e 11°. nucleotídeo da fita *sense* do siRNA, inativando-o (DANDE *et al.*, 2006).

Em células de mamíferos, não se pode utilizar dsRNA maiores de 30 pares de base. Moléculas acima desse número de pares de bases ativam a produção de interferon gama e da proteína quinase dependente de dsRNA (PKR), promovendo a morte celular programada. A ligação dsRNA-PKR promove a inibição da tradução de proteínas, levando a apoptose (PADDISON, CAUDY & HANNON, 2002). Somado a esse mecanismo, a PKR também ativa a síntese de RNase L, componente central da vias anti-virais, promovendo degradação abrangente e inespecífica do RNA celular (SVOBODA, STEIN & SCHULTZ, 2001).

O silenciamento genético pelo siRNA permite duas ações: investigação da função de um determinado gene por meio de experimentos de perda-de-função e terapêutica gênica. Em experimentos de perda de função, o *knockdown* do gene com siRNA promove a inibição da tradução da proteína, mudando o fenótipo da célula estudada ou mesmo evitando a transcrição de outro gene (LEE *et al.*, 2002). A utilização do RNA pequeno de interferência para

tratamento de doenças já é uma realidade. Algumas dessas pesquisas encontram-se em fase II. A *Alnylam Pharmaceuticals* atualmente testa clinicamente, em fase I, um siRNA chamado de ALB-RSV01 que atua como um antivírus para o vírus respiratório sincicial. A *Benitec* está desenvolvendo multi-siRNA para o controle do linfoma da AIDS, e a *Sirna Therapeutics* testa atualmente um siRNA que bloqueia o receptor 1 do VEGF nos pacientes com degeneração macular, inibindo a neovascularização anormal característica dessa doença (AIGNER, 2007).

A grande limitação do uso do siRNA para o *knockdown* genético *in vivo* e *in vitro* é a dificuldade para introduzi-lo na célula. Uma gama de estratégias foram desenvolvidas para transfectar o siRNA na célula alvo, entre elas o uso de vírus, plasmídios e lipossomos (SVOBODA, STEIN & SCHULTZ, 2001).

3.6.2- Princípios da transfecção genética

A terapia genética tem sido o alvo de pesquisa de varias instituições, entretanto, todo o avanço nesse campo está diretamente relacionado ao desenvolvimento de técnicas mais eficazes de entrega genética ou transfecção. O objetivo da transfecção é transferir eficientemente *in vitro* ou *in vivo* os materiais genéticos no interior das células dos tecidos alvos. Existem duas categorias de veículos facilitadores de transfecção: os biológicos e os não-biológicos. Cada grupo apresenta suas vantagens e desvantagens (BREYER *et al.*, 2001).

Os carreadores biológicos são os vírus. Fisiologicamente, estes transfeccionam seu material genético para a célula hospedeira. Na transfecção de pesquisa, utiliza-se engenharia genética para eliminar sua patogenicidade, sem reduzir a capacidade de transferência genética e adicionar o material genético que se deseja introduzir na célula. Entretanto, a utilização de vírus como agentes de transfecção traz alguns desafios, tais como a ativação do sistema

autoimune (no caso da transfecção *in vivo*) e a limitação de tamanho da sequência genética que se deseja transfeccionar (CUSACK & TANABE, 2002).

Os agentes de transfecção biológicos (vetores virais) podem ser de três tipos: retrovírus, adenovírus e adenovírus-associados. Retrovírus são pequenos vírus RNA com DNA de tamanho intermediário que se combina ao genoma da célula hospedeira induzindo a produção de proteínas virais. Os retrovírus apenas infeccionam células em mitose, sendo essa uma das principais limitações da técnica (LEWIS & EMERMAN, 1994).

Os adenovírus possuem dupla cadeia de DNA e infectam tanto células em divisão como células em latência. O uso de adenovírus não causa recombinação permanente do material genético à célula do hospedeiro, logo é necessária a utilização repetida desse vetor para obtenção do efeito desejado. Como nos retrovírus e em todos os vírus, sua atuação estimula o sistema imune, podendo com isso reduzir sua eficácia (KELLEY JR, 1984).

Os adenovírus-associados são vírus com uma cadeia de DNA simples. Possuem a capacidade de infectar tanto células em processo de divisão quanto aquelas que não estejam. Sua cadeia de DNA se integra ao genoma do hospedeiro como nos retrovírus. Esse vírus induz resposta imunológica de menor intensidade, pois sua recombinação homóloga ocorre em local específico, sem importância gênica, no cromossomo 19 (LEWIS & EMERMAN, 1994).

O segundo grupo, dos não biológicos, apresenta vantagens em relação ao primeiro no que diz respeito às duas limitações anteriormente citadas. Existem três tipos de agentes de transfecção não biológicos: polímeros catiônicos, peptídeos catiônicos e lipídeos catiônicos (BREYER *et al.*, 2001).

Os agentes de transfecção não biológicos são catiônicos, ou seja, interagem por meio de mecanismo eletrostático com o sítio negativo do DNA. Apesar dessa ligação, a carga total

do complexo formado pelo agente catiônico com material genético a ser entregue mantêm-se positiva, favorecendo a interação com a membrana celular e sua interiorização para a célula (BEHR, 1994).

Dos três agentes não biológicos, o mais utilizado é o lipídeo catiônico ou lipossomas. Estes se tornam catiônicos na presença do pH fisiológico. Os lipossomas em meio aquoso assumem a forma de vesículas e o DNA ou RNA associado a esse agente de transfecção se localiza entre as moléculas de lipídeos, formando uma estrutura similar a “sanduíche”. Devido à sua instabilidade, os complexos lipossoma-DNA são administrados diretamente após sua combinação (YI *et al.*, 2000).

4- JUSTIFICATIVA

A *CALPAIN5* é um gene alvo da regulação pelo *HOXA10* em camundongos. *HOXA10* é um fator transcripcional que é necessário para a receptividade endometrial e implantação embrionária. *HOXA10* é expresso em endométrio humano durante o ciclo menstrual, com expressão dependente dos níveis de estrogênio e progestogênio. Nossa hipótese para o presente trabalho foi que o gene *HOXA10* atuaria regulando a expressão do gene *CALPAIN5* no endométrio e decídua. Após a confirmação da capacidade regulatória do *HOXA10* sobre o *CALPAIN5*, postulamos que o gene dessa enzima estaria alterado em doenças onde o *HOXA10* também o estivesse e onde a apoptose se mostrasse alterada, tais como endometriose e pré-eclâmpsia.

- 1- Avaliar a regulação da *CALPAIN5* pelo *HOXA10* em células endometriais.
- 2- Avaliar a expressão da *CALPAIN5* no endométrio durante todo o ciclo menstrual.
- 3- Avaliar a expressão da *CALPAIN5* na decídua do primeiro e terceiro trimestres de gestações normais.
- 4- Avaliar se há um padrão de expressão anormal desse gene em decídua de pacientes com pré-eclampsia e em lesões de endometriose.

O presente trabalho foi desenvolvido no Departamento de Obstetrícia, Ginecologia e Ciências Reprodutivas da Universidade de Yale, Connecticut, Estados Unidos da América, em colaboração com o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e patrocinado pela CAPES e NIH.

6.1- Pacientes

Dez biópsias endometriais (cinco da fase proliferativa inicial e cinco da fase secretora tardia) foram obtidas de pacientes férteis que serviram de controle, sendo o diagnóstico de fertilidade determinado por ao menos uma gestação a termo. Biópsias de dez pacientes, com endometriose peritoneal, obtidas a partir de laparoscopia, confirmadas e datadas por histopatologia, foram comparadas com as amostras controle, sempre respeitando a mesma fase do ciclo menstrual. Todas as amostras das pacientes acima relacionadas encontravam-se estocadas no banco de tecidos do Departamento de Obstetrícia, Ginecologia e Ciências Reprodutivas da Universidade de Yale (Prof. Hugh Taylor) e as pacientes apresentavam ciclos menstruais regulares, estavam no menacme, não estavam usando nenhum tipo de medicação hormonal e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Três amostras de decídua de primeiro trimestre foram obtidas de pacientes submetidas a abortamento eletivo (permitido nos EUA), sendo excluídas as amostras onde o procedimento teve como indicação qualquer tipo de doença. Cinco amostras de decídua do terceiro trimestre e cinco amostras de decídua foram obtidas no terceiro trimestre de pacientes com pré-eclâmpsia (doadas pelo Prof. Charles Lockwood). Para o diagnóstico de pré-eclâmpsia utilizou-se os critérios de hipertensão arterial (≥ 140 mm Hg/90 mm Hg) e proteinúria de 24 horas ($\geq 0,3$ g). O presente trabalho foi aprovado pelo conselho de Ética Humana do Yale New Haven Hospital.

6.2- Preparação do plasmídio e siRNA

O *HOXA10* cDNA foi clonado no pcDNA3.1(+) sendo localizado no sítio EcoRI (Invitrogen, CA). Como controle foi utilizado pcDNA3.1(+) sem *HOXA10* cDNA (Invitrogen, CA). SiGenome duplex *HOXA10* siRNA (cat#b-002000-UB-015) e o controle não siRNA (cat#d-001210-02) foram utilizados (Dharmacon, IL).

6.3- Cultura celular

Foram utilizadas células endometriais estromais humanas (HESC) e células endometriais epiteliais de adenocarcinoma humano (Ishikawa) fornecidas pelos Doutores Charles Lockwood, Richard Hochberg e Susan Richmond. As HESC foram cultivadas com meio de cultura modificado livre de fenol vermelho e com HAM F-12 (Sigma, St. Louis, MO), complementado com 10% de aminoácidos, 1% de penicilina/streptomicina e 1% de piruvato de sódio. As células Ishikawa foram mantidas em meio de cultura não modificado (Sigma, St. Louis, MO), acrescentando todos os ingredientes citados anteriormente.

6.4- Transfecção genética em células humanas

As HESC foram cultivadas em frascos Falcon em condições ótimas de CO₂ e umidade. Quando atingiram confluência de 60 a 70% foram transferidas para placas com 6 poços e transfectadas usando TransIT-LT1 Mirus (Madison, WI) com pcDNA3.1(+), com pcDNA/*HOXA10* (utilizando-se 0,4µg para as placas de seis compartimentos) ou utilizando siRNA *HOXA10* de 23 pares de base desenvolvido pela Dharmacon, (IL - cat# D-001210-02) (20µg para as placas de 6 poços) e seu respectivo controle. As células Ishikawa também foram cultivadas até que chegassem à confluência de 45 – 55%, quando foram então transferidas para as placas de seis poços. Utilizando-se o lipofactime 2000 (Invitrogen, CA)

como agente facilitador foi realizada a transfecção utilizando pcDNA3.1(+), com pcDNA/*HOXA10* (utilizando-se 0,4µg para as placas de 6 poços) ou utilizado siRNA *HOXA10* (20µg para as placas de 6 poços) e seu respectivo controle. Após 4 horas do início da transfecção os meios de cultura foram trocados e 48 horas do início do procedimento as células foram retiradas, identificadas e o RNA extraído segundo o protocolo do fabricante. Todas as transfecções foram realizadas em triplicata.

6.5- PCR em tempo Real

A PCR em tempo real foi realizada a partir do kit Lightcyle SYBR *green* da (Roche, NY). Foi preparada solução total de 20µl contendo 10mM de dATP, dCTP e dTTP; 20 pmol oligo(dT), 40U/µl inibidor da ribonuclease, 10U/µl do *avian myeloblastose virus-reverse* transcriptase e 10x AMVRT buffer, adicionou-se 1µg do RNA total da amostra a solução final foi mantida a 61°C por 30 minutos.

As PCRs para o *HOXA10* e *CALPAIN5* eram constituídas por 45 ciclos a 95°C por 2 segundos, depois 65°C por 5 segundos e 72°C por 18 segundos. Para o controle da PCR foi utilizado gene da beta-actina e para a qual foram realizados 45 ciclos de 95°C de 2 segundos, 61°C por 5 segundos, 72°C por 18 segundos. Os *primers* para a sequência *exon-exon* do gene *HOXA10* foram confeccionados a partir de experimento pregresso realizado por esse grupo de pesquisadores e os *primers* para *exons* de *CALPAIN5* foram desenhados utilizando-se o programa *Primer3*, fornecido gratuitamente pelo *Whitehead Institute for Biomedical Research* (FEI, CHUNG & TAYLOR, 2005). Utilizaram-se *primers* que produzissem produtos de 211pb para RNA e 1389pb para DNA.

Primers do gene *HOXA10*:

Sense: 5'-GCCCTTCCGAGGCAGCAAAG-3'

Antisense: 5'-AGGTGGACGCTGCGGCTAATAATCTCTA-3'

Primers do gene *CALPAIN5*:

Sense: 5'-ACGGTGAGTTCTGGATGACC-3

Antisense: 5'-CTGTGGGTTCTGGAAGAAGG-3'

O aumento da fluorescência foi monitorizado pelo *Roche Light Cycler*, demonstrando assim a amplificação dos produtos gerados pela PCR em tempo real. A partir desses resultados analisou-se o número de vezes de variação do gene estudado em relação ao controle interno da beta-actina, por meio da equação $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Os *primers* da beta-actina seguiram o padrão já utilizado pelo laboratório (OKUDA et al., 2004). Ao final do processo criou-se *curva de melting* para avaliar a especificidade do método (formação de *dímeros-primers*). A PCR em tempo real foi realizada sempre em triplicata e foi aceito uma eficiência entre 80 e 100%. O experimento foi realizado em duplicata e a amostra analisada sempre em triplicata para se obter a média.

6.6- Técnica da Imunohistoquímica

A expressão citoplasmática da proteína CALPAIN5 foi observada por meio de técnica imunohistoquímica, utilizando-se anticorpos policlonais à base de soro de coelho (Triple Point Biologics, Inc. CA). As amostras estavam conservadas em cortes parafinados de 5-mm. Utilizando-se xileno e etanol, a parafina foi retirada das amostras. As peroxidases endógenas dos tecidos foram bloqueadas com a utilização de H₂O₂ a 3%. Após incubação das amostras com 1,5% de soro de cabra por 45 minutos, as lâminas foram incubadas por uma noite a 4° C com o anticorpo principal (*CALPAIN5* 1:3000). Após uma noite de incubação as amostras eram expostas por 60 minutos na temperatura ambiente ao anticorpo secundário anti-coelho feito em soro de cabra e depois marcado de biotilado de peroxidase (Vectastain; Vector

Laboratories, CA). Avaliou-se a marcação celular em cinco campos microscópicos não adjacentes com cem células cada.

6.7- *Hscore*

Os resultados da imunohistoquímica foram obtidos observando a marcação intracitoplásmica de forma semi-quantitativa, também conhecida como *Hscore* (BUDWIT_NOVOTY *et al.*, 1986 LESSEY *et al.*, 1988). A intensidade da marcação foi caracterizada segundo as seguintes graduações: não marcado (0), quase indetectável, (1), detectável (2), fortemente marcado (3). O *Hscore* foi calculado pela fórmula $H = \sum P_i x i$, considerando **P** como a porcentagem de células onde houve marcação pelo anticorpo e **i** a intensidade de marcação da proteína nas células (0, 1, 2 ou 3). O epitélio glandular, estroma endometrial e as células decíduais foram analisados individualmente por dois diferentes observadores e a porcentagem de células marcadas anotadas para *Hscore*.

6.8- Análise Estatística

Optou-se pelo uso do teste *t* para os dados paramétricos do resultado da PCR em tempo real. Para os dados não paramétricos do *Hscore*, utilizou-se o teste de ANOVA com o *test pos-hoc*, adotando-se o valor de $\alpha = 0,05$

7.1- Expressão da CALPAIN5 no endométrio

A imunohistoquímica mostrou que a CALPAIN5 é expressa tanto nas células estromais, como epiteliais glandulares durante todo o ciclo menstrual no endométrio eutópico. A expressão da CALPAIN5 foi observada no citoplasma das células endometriais estromais e epiteliais glandulares e decídua. A análise quantitativa do *Hscore* demonstrou que a CALPAIN5 está mais expressa na decídua do primeiro trimestre do que nas fases proliferativas e secretoras do ciclo menstrual (Figuras 3-4-5 a e b). Avaliadas pelo *Hscore* e imunohistoquímica, não se observou nenhuma diferença quando se comparou a concentração da CALPAIN5 nas células glandulares e estromais, quando comparadas às fases do ciclo menstrual.

7.2- Expressão da CALPAIN5 na decídua.

A CALPAIN5 é expressa tanto na decídua de primeiro como de terceiro trimestres. Entretanto, as concentrações dessa protease na decídua de primeiro trimestre é maior que no termo (Figura 3 d e f).

Figura 1- Imunohistoquímica da proteína citoplasmática CALPAIN5: A) Controle endométrio; B) Endométrio proliferativo; C) Endométrio secretor; D) Decídua do primeiro trimestre; E) Endométrio ectópico de pacientes portadoras de endometriose; F) Decídua do terceiro trimestre de pacientes com gestação normal; G) Decídua do terceiro trimestre de pacientes com pré-eclâmpsia.

Figura 2- Expressão da CALPAIN5 nas glândulas e estroma do endométrio proliferativo e secretor. Avaliado pelo *Hscore*.

Figura 3a- Comparação entre a expressão da CALPAIN5 na decídua de primeiro trimestre e endométrio secretor, avaliado pelo *Hscore*. * ($p < 0,05$)

Figura 3b- Comparação entre a expressão da CALPAIN5 na decídua de primeiro trimestre e decídua do terceiro trimestre avaliado pelo H-score. * ($p < 0,05$)

7.3- A expressão da *CALPAIN5* e sua regulação pelo *HOXA10*

A confirmação da efetividade do processo de transfecção foi confirmada pela realização da PCR em tempo real a partir do RNAm *HOXA10* obtido das amostras (Figura 6). Por meio da transfecção foi possível provar a regulação da *CALPAIN5* pelo *HOXA10*. Em HESC, a partir da transfecção o pcDNA3.1/*HOXA10* aumentou as concentrações de RNAm da *CALPAIN5* em onze vezes ($p < 0,05$) e o *HOXA10* siRNA reduziu a expressão da *CALPAIN5* em vinte três vezes ($p < 0,05$). *CALPAIN5* foi regulada pelo *HOXA10* em células endometriais estromais. A transfecção com pcDNA3.1/*HOXA10* e *HOXA10* siRNA não regulou a expressão da *CALPAIN5* nas células glandulares.

Figura 4- Expressão relativa do RNA de *HOXA10* e *CALPAIN5* pela transfecção com pcDNA/*HOXA10* e siRNA/*HOXA10* em células endometriais estromais humanas. * ($p < 0,05$)

7.4- A expressão da CALPAIN5 na endometriose e na pré-eclâmpsia

Observou-se que a expressão da protease CALPAIN5 está reduzida na endometriose e aumentada na pré-eclâmpsia. Nas amostras obtidas das pacientes com endometriose, a imunohistoquímica e o *Hscore* demonstraram redução de 50% na expressão da CALPAIN5, quando comparados com o controle (figura 7), sendo essa redução tanto em células estromais endometriais como epiteliais glandulares.

Nas decíduas de pacientes com pré-eclâmpsia, houve aumento significativo da expressão da CALPAIN5 quando comparado com os controles (normotensas) da mesma

época gestacional (figura 8). A expressão da CALPAIN5 aumentou em 20% nas pacientes portadoras de pré-eclâmpsia. Em especial, houve marcação das células vasculares endoteliais das decíduas de terceiro trimestre de pacientes com pré-eclâmpsia.

Figura 5- Expressão da CALPAIN5 no endométrio tópico de pacientes do grupo controle e no endométrio ectópico de pacientes com endometriose. * $p < 0,05$

Figura 6- Comparação entre a expressão citoplasmática da CALPAIN5 em decídua do terceiro trimestre de pacientes com pré-eclâmpsia e pacientes controles. $P < 0,05$

O *HOXA10* é essencial tanto para o desenvolvimento uterino durante a vida embrionária como para o processo de implantação durante a vida adulta. Camundongos *HOXA10* (-/-) ou camundongos onde o *HOXA10* tenha sido bloqueado, usando DNA *antisense* DNA, apresentam redução do número de embriões e das taxas de implantação (BENSO *et al.*, 1996 ; BLOCK *et al.*, 2000; SATOKADA; BENSON; MASS, 1995).

Estudos pregressos já definiram a função do *HOXA10* (AKBAS, SONG & TAYLOR; 2004). Entretanto, o mecanismo molecular pelo qual *HOXA10* atua não está totalmente caracterizado. Sabe-se que o *HOXA10* é um fator de transcrição que interage com genes co-fatores tais como a *CALPAIN5*. Usando um processo de transfecção genética, este estudo confirma e demonstra potencial de interação gene-gene entre *HOXA10* e *CALPAIN5* em células humanas do estroma. O *CALPAIN5* mostrou o mesmo padrão de expressão gênica do *HOXA10*. Na presença do plasmídio contendo *HOXA10*, tanto *CALPAIN5* como *HOXA10* apresentaram aumento da expressão em células estromais endometriais humanas. Da mesma forma, quando se utilizou o siRNA *HOXA10*, ambos os genes apresentaram redução da expressão.

As calpaínas, em especial *CALPAIN5*, estão relacionadas a várias funções celulares, tais como diferenciação celular e principalmente apoptose (SUZUKI *et al.*, 2004). Duas observações relacionam as calpaínas com a apoptose: i) a expressão da calpaína durante o processo de morte celular; e ii) a capacidade de se reduzir a apoptose através de inibidores das calpaínas (BOSZYCZKO-COYNE *et al.*, 2001, BAO *et al.*, 2002). A principal ação das calpaínas sobre a apoptose é a ativação da via das caspases. Essa ativação já foi demonstrada tanto no neurônio, quanto no ovário e mama (BAO *et al.*, 2002). Essa ativação da via das caspases pode ocorrer pela via intrínseca (estímulo do citocromo c da mitocôndria que irá ativar a caspase-9) ou pela via extrínseca, onde o processo se inicia pela ativação do *fans*, que

por sua vez estimula as caspases-8 ou 10. Ambas as vias (intrínseca e extrínseca) estimulam a caspase-3, que então determina a apoptose. Entretanto, Pike *et al.* (2000) observaram que as calpaínas não se limitam apenas à via das caspases para induzir a apoptose. Demonstraram, pela primeira vez, que durante a ativação plaquetária, as calpaínas promovem apoptose independente das caspases (HOUWERZIJL *et al.*, 2006). Nessa via apoptose-caspase-independente, a mitocôndria é um fator determinante, pois libera o fator de indução da apoptose. A apoptose-caspase-independente é uma importante ferramenta para ativação da apoptose, a partir de estímulos citotóxicos ou indutores da morte celular, quando a via das caspases falhar em promovê-la (ARTUS *et al.*, 2006). Nesse sentido, a possibilidade das calpaínas controlarem ambos os processos demonstra a importância desse gene no controle da homeostase corporal.

A *CALPAIN5* ou *Htra-3* é um homólogo específico da tra-3 do *Caenorhabditis elegans* (SYNTICHAKI *et al.*, 2002). O padrão de expressão da *CALPAIN5* é o mesmo nos diferentes tecidos, sendo expresso também no útero e na placenta. A função exata da *CALPAIN5* não está totalmente definida, porém apresenta grande expressão em tecidos reprodutivos tais como testículos, ovários e útero. A principal hipótese é de que a *CALPAIN5* esteja relacionada ao processo apoptótico (WAGHRAY *et al.*, 2004). A semelhança da *CALPAIN5* entre homem e camundongo é de aproximadamente 87% quando se analisa o RNAm e 95% para a proteína. Os modelos usando camundongos mostram que a *CALPAIN5* é pouco expressa no útero antes da gravidez, mas sofre grande ativação durante o período gestacional, especialmente nas células decíduais. Na verdade, as células da decídua são as únicas que expressam a *CALPAIN5* durante a gravidez inicial e a gravidez tardia (NIE *et al.*, 2003).

Neste estudo foi possível demonstrar, pioneiramente, o padrão de expressão da *CALPAIN5* nas células estromais endometriais durante o ciclo menstrual. A expressão da *CALPAIN5* não mostrou variação estatisticamente significativa entre a fase folicular e a fase lútea. Está definido na literatura que a expressão da *HOXA10* aumenta durante a fase lútea, em especial no período conhecido como janela de implantação (TAYLOR, 2002). Embora a transfecção genética tenha mostrado a regulação da *CALPAIN5* pelo *HOXA10*, na avaliação da imunohistoquímica do ciclo menstrual isso não ficou provado. A hipótese para explicar esse fenômeno seria a presença de um ou mais co-fatores que também interfeririam, durante a fase lútea, sobre a expressão gênica da *HOXA10*. Estes resultados diferem dos apresentados por Niel *et al.* (2006) que mostraram um aumento da *CALPAIN5* durante a fase secretora. Tanto o *HOXA10* quanto a *CALPAIN5*, além de serem expressos durante o ciclo menstrual, estão presentes tanto nas decíduas de placentas do primeiro trimestre como nas decíduas de placentas do terceiro trimestre. Nesse ponto os resultados deste trabalho confirmam os dados apresentados pelos autores antes citados. Em especial, observou-se aumento significativo na expressão da *CALPAIN5* na decídua do primeiro trimestre quando comparadas com as fases do ciclo menstrual.

Após definir-se o padrão de expressão da *CALPAIN5* durante o ciclo menstrual e gravidez, avaliou-se a *CALPAIN5* em doenças onde a disrupção do *HOXA10* e alterações nos mecanismos apoptóticos estavam envolvidos. O *HOXA10* está menos expresso em endométrios ectópicos de pacientes portadoras de endometriose (BROWNE & TAYLOR 2006). Portanto, avaliou-se a expressão da *CALPAIN5* no tecido ectópico. A endometriose é caracterizada pela presença de endométrio fora da cavidade uterina. Existem várias teorias sobre a etiologia dessa doença, porém, a mais aceita é a menstruação retrógrada e a perpetuação do tecido endometrial nas áreas ectópicas (SAMPSON, 1924). A patogênese

dessa doença está relacionada com o descontrole da homeostase nas pacientes portadoras de endometriose (WIGFIELD *et al.*, 1995). No presente estudo a imunohistoquímica mostrou redução da presença da proteína CALPAIN5 no endométrio ectópico das pacientes com endometriose. A ação da CALPAIN5 no endométrio está provavelmente relacionada com a apoptose. Este dado pode explicar porque a CALPAIN5 está pouco expressa na endometriose. Possivelmente, a redução da expressão da CALPAIN5 seja uma dos mecanismos pelo qual a apoptose esteja diminuída, interferindo no balanço homeostático e promovendo a perpetuação do tecido ectópico (LEE; ABOUHAMED & THEVENOD, 2006). Somado a isso, a redução da expressão da CALPAIN5 nos tecido ectópico e a conseqüente redução da apoptose pode estar relacionado com a redução das taxas de gravidez relacionada com essa doença. Da mesma forma, pode-se fazer uma ilação de que a CALPAIN5 é a ferramenta pela qual o *HOXA10* controla a apoptose no endométrio normal.

Um grande número de proteínas é determinante para o processo de placentação humana, mas os componentes moleculares e genéticos envolvidos não são bem conhecidos, especialmente durante algumas doenças como o aborto e a pré-eclâmpsia. Uma das mais importantes adaptações durante a gravidez é o processo de invasão citotrofoblástica através de toda a espessura da decídua, em especial na vasculatura decidual materna (CROSS; WERB & FISHER 1994). A falha do processo de invasão citotrofoblástica e a conseqüente redução da transformação das artérias espiraladas é uma das características fisiopatológicas da pré-eclâmpsia (ZHOU; DAMSKY & FISHER 1997). Durante a invasão do citotrofoblasto nas decíduas, a apoptose é determinante para facilitar esse processo já que facilita a invasão. Genes diferentes estão relacionados com a regulação da apoptose durante a invasão citotrofoblástica, entre eles a aspartil protease decidual 1 (APD1), que está diretamente relacionada com a pré-eclâmpsia, pois regula a ativação do gene da caspase-2 durante o

processo de invasão (MOSES *et al.*, 1999). Nossa hipótese é que a *CALPAIN5* seria mais um gene que poderia controlar a apoptose na pré-eclâmpsia, tanto pela via caspase-dependente como pela via independente, uma vez que há o padrão anormal de sua expressão nessa doença.

Estudo observacional recente mostrou que pacientes com endometriose apresentam baixo risco para o desenvolvimento da pré-eclâmpsia (BROSENS *et al.*, 2006). A probabilidade para uma paciente portadora de endometriose desenvolver pré-eclâmpsia é cinco vezes menor que em pacientes sem endometriose. Os dados obtidos nesse estudo permitem especular que a ação da *CALPAIN5* no processo apoptótico possa estar envolvida na etiopatogenia da endometriose e da pré-eclâmpsia e possa eventualmente explicar esses dados que mostram que pacientes endometrióticas têm menor chance de desenvolver pré-eclâmpsia.

Nosso estudo reportou a expressão da *CALPAIN5* no endométrio e decídua humanos e também descreveu a regulação da expressão da *CALPAIN5* pelo *HOXA10* e sua expressão aberrante em desordens do trato reprodutivo, como a endometriose e pré-eclâmpsia. Esse é o primeiro relato da expressão dessa molécula no trato reprodutivo e pela primeira vez essa molécula foi relacionada a um estado de doença do organismo humano.

Com os dados deste trabalho foi possível concluir que:

1. A *CALPAIN5* é regulada pelo *HOXA10* em células endometriais estromais humanas.
2. A *CALPAIN5* é expressa no endométrio e na decídua humanos.
3. Há um padrão de expressão anormal da *CALPAIN5* no tecido endometriótico e em pacientes com pré-eclâmpsia.

Um ponto futuro que deve ser avaliado é se a *CALPAIN5*, através do seu controle sobre a apoptose, constitua um mecanismo pelo qual o organismo materno promova a hemóstase intra-uterina durante as fases iniciais da gravidez.

Outra perspectiva é tentar o *knockdown* da *CALPAIN5* na pré-eclâmpsia na tentativa de reduzir os subprodutos da apoptose aberrante e favorecer o quadro clínico. Da mesma forma, a possibilidade de terapêutica com promotores do gene da *CALPAIN5* nas pacientes com endometriose com o objetivo de aumentar a apoptose e re-equilibrar a hemóstase tecidual pode se tornar viável.

11- REFERÊNCIAS*

* De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Style)- Grupo de Vancouver. JAMA 1997;277:927-934.

- 1- Aigner A. Delivery systems for the direct application of siRNAs to induce RNA interference (RNAi) in vivo. *J Biomed Biotechnol.* 2006;2006(4):71659.
- 2- Akbas GE, Song J, Taylor HS. HOXA10 estrogen response element (ERE) is differentially regulated by 17 beta-estradiol and diethylstilbestrol (DES). *J Mol Biol.* 2004;340:1013-23.
- 3- Artus C, Maquarre E, Moubarak RS, Delettre C, Jasmin C, Susin SA, *et al.*. CD44 ligation induces caspase-independent cell death via a novel calpain/AIF pathway in human erythroleukemia cells. *Oncogene.* 2006;25:5741-51.
- 4- Bao JJ, Le XF, Wang RY, Yuan J, Wang L, Atkinson EN, *et al.* Reexpression of the tumor suppressor gene ARHI induces apoptosis in ovarian and breast cancer cells through a caspase-independent calpain-dependent pathway. *Cancer Res.* 2002;62:7264-72.
- 5- Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2002;77:1148-55.
- 6- Behr B. Blastocyst culture and transfer. *Hum Reprod.* 1999;14:5-6.
- 7- Benson GV, Lim H, Paria BC, Satokata I, Dey SK, Maas RL. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development.* 1996;122:2687-96.
- 8- Block K, Kardana A, Igarashi P, Taylor HS. In utero diethylstilbestrol (DES) exposure alters Hox gene expression in the developing mullerian system. *FASEB J.* 2000;14:1101-8.
- 9- Boszyczko-Coyne D, O’Kane TM, Wu ZL, Dobrzanski P, Murthy S, Vaught JL, *et al.* CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of SAPK/JNK pathway activation, promotes survival and blocks multiple events associated with abeta induced cortical neuron apoptosis. *Neurochem* 2001;77:849–63.

- 10- Branch AD. A hitchhiker's guide to antisense and nonantisense biochemical pathways. *Hepatology*. 1996;24:1517-29.
- 11- Braun DP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Dmowski WP. Relationship between apoptosis and the number of macrophages in eutopic endometrium from women with and without endometriosis. *Fertil Steril*. 2002;78:830-5.
- 12- Breyer B, Jiang W, Cheng H, Zhou L, Paul R, Feng T, *et al*. Adenoviral vector-mediated gene transfer for human gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2001;1:149-62.
- 13- Brosens IA, De Sutter P, Hamerlynck T, Imeraj L, Yao Z, Cloke B, *et al*. Endometriosis is associated with a decreased risk of pre-eclampsia. *Hum Reprod*. 2007;22:1725-9
- 14- Browne H, Taylor H. HOXA10 expression in ectopic endometrial tissue. *Fertil Steril*. 2006;85:1386-90.
- 15- Budwit-Novotny DA, McCarty KS, Cox EB, Soper JT, Mutch DG, Creasman WT, *et al*. Immunohistochemical analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1986; 46:5419-25.
- 16- Casey BP, Glazer PM. Gene targeting via triple-helix formation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001;67:163-92.
- 17- Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*. 1994;266:1508-18.
- 18- Cusack JC Jr, Tanabe KK. Introduction to cancer gene therapy. *Surg Oncol Clin N Am*. 2002;11:497-519.
- 19- Dabrosin C, Gyorffy S, Margetts P, Ross C, Gauldie J. Therapeutic effect of angiostatin gene transfer in a murine model of endometriosis. *Am J Pathol*. 2002;161:909-18.
- 20- Dande P, Prakash TP, Sioufi N, Gaus H, Jarres R, Berdeja A, *et al*. Improving RNA interference in mammalian cells by 4'-thio-modified small interfering RNA (siRNA):

- effect on siRNA activity and nuclease stability when used in combination with 2'-O-alkyl modifications. *J Med Chem.* 2006;49:1624-34.
- 21-Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, *et al.* Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature.* 1987;330:576-8.
- 22- Douglas KA, Redman CW. Eclampsia in the United Kingdom. *BMJ.* 1994;309:1395-400.
- 23- Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ.* 2005;330:565.
- 24- Fei X, Chung H, Taylor HS. Methoxychlor disrupts uterine Hoxa10 gene expression. *Endocrinology.* 2005;146:3445-51
- 25- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391:806-11.
- 26- Gao G, Dou QP. N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem.* 2000;80:53-72.
- 27- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev.* 2003;83:731-801.
- 28- Gonzalez A, Saez ME, Aragon MJ, Galan JJ, Vettori P, Molina L, *et al.* Specific haplotypes of the CALPAIN-5 gene are associated with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2006; 21:943-51
- 29- Graham A, Papalopulu N, Lorimer J, McVey JH, Tuddenham EG, Krumlauf R. Characterization of a murine homeo box gene, Hox-2.6, related to the *Drosophila* deformed gene. *Genes Dev.* 1988;2:1424-38.

- 30- Higuchi M, Iwata N, Saido TC. Understanding molecular mechanisms of proteolysis in Alzheimer's disease: progress toward therapeutic interventions. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1751:60-7.
- 31- Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJ, Louwes H, Esselink MT, Smit JW, *et al*. Increased peripheral platelet destruction and caspase-3-independent programmed cell death of bone marrow megakaryocytes in myelodysplastic patients. *Blood*. 2005;105:3472-9
- 32- Janicki TI, David LJ, Skaf R. Massive and acute hemoperitoneum due to rupture of the uterine artery by erosion from an endometriotic lesion. *Fertil Steril*. 2002;78:879-81.
- 33- Kadyrov M, Schmitz C, Black S, Kaufmann P, Huppertz B. Pre-eclampsia and maternal anaemia display reduced apoptosis and opposite invasive phenotypes of extravillous trophoblast. *Placenta* 2003;24:540-8.
- 34- Kang ES, Kim HJ, Nam M, Nam CM, Ahn CW, Cha BS, *et al*. A novel 111/121 diplotype in the Calpain-10 gene is associated with type 2 diabetes. *J Hum Genet*. 2006;51:629-33.
- 35- Kelley Jr TJ. Adenovirus DNA replication, in: HS Ginsberg (Ed.), *The adenovirus*, Plenum, New York, 1984:271-301.
- 36- Kim JJ, Fazleabas AT. Uterine receptivity and implantation: the regulation and action of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1), HOXA10 and forkhead transcription factor-1 (FOXO-1) in the baboon endometrium. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:34
- 37- Lappin TR, Grier DG, Thompson A, Halliday HL. HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. *Ulster Med J*. 2006;75:23-31.

- 38- Lee FY, Kim DW, Karmin JA, Hong D, Chang SS, Fujisawa M, *et al.* mu-Calpain regulates receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)-supported osteoclastogenesis via NF-kappaB activation in RAW 264.7 cells. *J Biol Chem.* 2005;280:29929-36.
- 39- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002;21:4663-70
- 40- Lee WK, Abouhamed M, Thevenod F. Caspase-dependent and -independent pathways for cadmium-induced apoptosis in cultured kidney proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;291:F823-32.
- 41- Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, *et al.*. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;67:334-40
- 42- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods.* 2001;25:402-8.
- 43- Lyall F. Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy--a review. *Placenta.* 2005;26(Suppl A):S31-6.
- 44- Lewis PF, Emerman M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol.* 1994;68:510-6
- 45- Manis JP. Knock out, knock in, knock down--genetically manipulated mice and the Nobel Prize. *N Engl J Med.* 2007;357:2426-9.
- 46- Marshall C, Hitman GA, Partridge CJ, Clark A, Ma H, Shearer TR, *et al.* Evidence that an isoform of calpain-10 is a regulator of exocytosis in pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol.* 2005;19:213-24.

- 47- Moses EK, Freed KA, Higgins JR, Brennecke SP. Alternative forms of a novel aspartyl protease gene are differentially expressed in human gestational tissues. *Mol Hum Reprod.* 1999;5:983-9.
- 48- Mouatt-Prigent A, Karlsson JO, Agid Y, Hirsch EC. Increased M-calpain expression in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease but not in other neurodegenerative disorders involving the mesencephalon: a role in nerve cell death? *Neuroscience.* 1996;73:979-87.
- 49- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell.* 1990;2:279-289.
- 50- Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol.* 2000;150:887-94.
- 51- Neale D, Demasio K, Illuzi J, Chaiworapongsa T, Romero R, Mor G. Maternal serum of women with pre-eclampsia reduces trophoblast cell viability: evidence for an increased sensitivity to Fas-mediated apoptosis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2003;13:39-44.
- 52- Nie G-Y, Li Y, Minoura H, Batten L, Ooi GT, Findlay JK, *et al.* A novel serine protease of the mammalian HtrA family is up-regulated in mouse uterus coinciding with placentation. *Mol Hum Reprod* 2003;9:279-90.
- 53- Nogueira AP; Abrão MS. Endometriose: as hipóteses etiopatogênicas atuais. In: Abrão MS (Eds). *Endometriose: uma visão contemporânea.* Livraria e Editora Revinter Ltda.SP 2000; cap 2.
- 54- Pike BR, Zhao X, Newcomb JK, Glenn CC, Anderson DK, Hayes RL. Stretch injury causes calpain and caspase-3 activation and necrotic and apoptotic cell death in septo-hippocampal cell cultures. *J Neurotrauma.* 2000;17:283-98.

- 55- Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:1443-8.
- 56- Polster BM, Basañez G, Etxebarria A, Hardwick JM, Nicholls DG. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem*. 2005;280:6447-54.
- 57- Polster BM, Fiskum G. Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *J Neurochem*. 2004;90:1281-9.
- 58- Okuda T, Kinoshita Y, Tamura T, Kato C, Kojima H, Watanabe A, Honjo H. Quantitative analysis of cellular fetal hemoglobin gamma chain messenger RNA (HbF-gamma mRNA) in maternal peripheral blood. *Prenat Diagn*. 2004;24:881-6.
- 59- Ray SK, Matzelle DD, Sribnick EA, Guyton MK, Wingrave JM, Banik NL. Calpain inhibitor prevented apoptosis and maintained transcription of proteolipid protein and myelin basic protein genes in rat spinal cord injury. *J Chem Neuroanat*. 2003;26:119-24.
- 60- Recently Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Endometriosis and infertility. *Fertil Steril*. 2006:S156-60.
- 61- Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, *et al*. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest*. 2004;114:744-54.
- 62- Saez ME, Ramirez-Lorca R, Moron FJ, Ruiz A. The therapeutic potential of the calpain family: new aspects. *Drug Discov Today*. 2006;11:917-23.
- 63- Saito S, Sakai M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2003;59:161-73.
- 64- Sampson JA. Benign and malignant endometrial implants in peritoneal cavity, and their relation to certain ovarian tumors. *Surg Gynecol Obstet* 1924;38:287-311.

- 65- Satokata I, Benson G, Maas R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature*. 1995; 374:460-3
- 66- Sibai BM. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2003;102:181-92.
- 67- Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*. 2004;53 (Suppl 1):S12-8.
- 68- Svoboda P, Stein P, Schultz RM. RNAi in mouse oocytes and preimplantation embryos: effectiveness of hairpin dsRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;287:1099-104.
- 69- Syntichaki P, Xu K, Driscoll M, Tavernarakis N. Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature*. 2002; 419:939-44.
- 70- Taylor HS. Transcriptional regulation of implantation by HOX genes. *Rev Endocr Metab Disord*. 2002;3:127-32.
- 71- Taylor HS, Arici A, Olive D, Igarashi P. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest*. 1998;101:1379-84
- 72- Taylor HS, Bagot CN, Troy PJ. Alteration of maternal Hoxa10 expression by in vivo gene transfection affects implantation. *Gene Ther*. 2000;7:1378-84.
- 73- Taylor HS, Block K, Bick DP, Sherins RJ, Layman LC. Mutation analysis of the EMX2 gene in Kallmann's syndrome. *Fertil Steril*. 1999;72:910-4.
- 74- Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*. 1986;44:419-28
- 75- Vigano P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P,. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18:177–200.

- 76- Yi SW, Yune TY, Kim TW, Chung H, Choi YW, Kwon IC, *et al.* A cationic lipid emulsion/DNA complex as a physically stable and serum-resistant gene delivery system. *Pharm Res.* 2000;17:314-20.
- 77- Yokoyama Y, Narahara K, Tsuji K, Ninomiya S, Seino Y. Autosomal dominant congenital cataract and microphthalmia associated with a familial t(2;16) translocation. *Hum Genet.* 1992;90:177-8.
- 78- Zatz M, Starling A. Calpains and disease. *N Engl J Med.* 2005;352:2413-23
- 79- Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest.* 1997;99:2152-64.
- 80- Waghray A, Wang DS, McKinsey D, Hayes RL, Wang KK. Molecular cloning and characterization of rat and human calpain-5. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;21:453-73.
- 81- Wheeler JM. Epidemiology of endometriosis-associated infertility. *J Reprod Med.* 1989;34:41-6.
- 82- Wigfield M, Macpherson A, Healy D, Rogers P. Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1995;64:340–6.
- 83- Working group on high pressure in pregnancy. Report of the national high blood pressure education program working group on high pressure. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:S1-S22.
- 84- Wu MY, Ho HN. The role of cytokines in endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2003;49:285-96.

CALPAIN5 expression is regulated by *HOXA10* in human endometrial cells and deciduas: aberrant regulation in endometriosis and pre-eclampsia.

Ivan Penna, Hongling Du, Rui Ferriani, Hugh S Taylor

Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA. (I.A.P., H.D., H.S.T) and Department of Obstetrics and Gynecology of Ribeirão Preto Medical School/ São Paulo University, Ribeirão Preto, SP, Brazil.(I.A.P., R.A.F).

Abbreviated title: *CALPAIN5* in normal and abnormal endometrium.

Key-terms: *HOXA10*, *CALPAIN5*, endometrium, endometriosis, pre-eclampsia

Word count: 3,946

Correspondence: Hugh S Taylor, MD
Division of Reproductive Endocrinology and Infertility
Yale University School of Medicine
333 Cedar Street
New Haven, Connecticut 06520
hugh.haylor@yale.edu
Phone 203-785-4005
Fax 203-785-7819

Supported by NIH36887, CAPES/Br

Abstract

Context and Objective: Calpains have been implicated in the regulation of apoptosis. Here we identified *CALPAIN5* as a target of *HOXA10* transcriptional regulation in endometrium as well as aberrant regulation in women with endometriosis and pre-eclampsia

Patients and Methods: Histologically confirmed biopsies of endometriosis were obtained from ten women at the time of surgery and by endometrial biopsy from controls. Third trimester decidual samples from controls and decidual samples from women with pre-eclampsia were obtained at the time in labor. Immunohistochemistry was used to identify *CALPAIN5* expression. Human endometrial stromal and epithelial cell lines were transfected with pcDNA/*HOXA10*, *HOXA10* siRNA or respective controls. qRT-PCR was performed to determine expression of *HOXA10* and *CALPAIN5* in each group.

Results: *CALPAIN5* was expressed in endometrial stromal and glandular cells throughout the menstrual cycle and in decidua. *CALPAIN5* protein expression decreased in both stromal and glandular cells from women with endometriosis compared to that of fertile controls. Decidua from pre-eclamptics expressed *CALPAIN5* at higher levels than controls. Transfection of endometrial cells with a *HOXA10* expression construct led to increased *CALPAIN5* expression, while transfection with siRNA resulted in a decrease.

Conclusion: *CALPAIN5* is expressed in endometrium and decidua. *CALPAIN5* expression is regulated by *HOXA10*, upregulated in the decidua of women with pre-eclampsia and decreased in endometriosis compared to eutopic endometrium.

Key words: *CALPAIN5*, *HOXA10*, endometrium, endometriosis, pre-eclampsia

Introduction

Calpains are cytoplasmatic cysteine proteases that depend of calcium ions for activity. The calpain family has fourth members whose functions are not fully characterized. Calpains have been implicated in several different cellular activities including the regulation apoptosis of cell differentiation.(1) Mutations in members of the calpain family have been identified in several human diseases. Limb-girle muscular dystrophy type 2A is seen with mutation of *CALPAIN3* and the type II diabetes has been linked to *CALPAIN10* mutation.(1) There have been no prior reports implicating *CALPAIN5* in disease.

The mouse and human orthologs of *CALPAIN5* show significant similarity, 87% DNA and 95% protein sequence identity. *CALPAIN5* also shares homology with *C. elegans* tra-3(2). *CALPAIN5* is expressed in the ovaries, nervous system and placenta.(3) *CALPAIN5* expression has not yet been characterized in the Müllerian tract.

We previously conducted a microarray screen of murine endometrium after transfection with pcDNA/HOXA10 or antisense-HOXA10.(4) We identified *CALPAIN5* as a putative target gene of *HOXA10* regulation in the mouse. *HOXA10* is a transcription factor that is necessary for endometrial receptivity and embryo implantation. Altering the endometrial expression levels of *HOXA10* in murine endometrium results in corresponding alterations in embryo implantation rates.(5,6) *HOXA10* is expressed in human endometrium during the menstrual cycle, where its expression is regulated by estrogen and progesterone.(6) Endometrial epithelial and stromal *HOXA10* expression levels are up-regulated in the midluteal phase, coincident with the time of implantation.(6,7) Here we investigated the possibility that *CALPAIN5* was expressed in human endometrium and regulated by *HOXA10*.

In this study, we report the expression of *CALPAIN5* in the human endometrium and in decidua. We also describe the regulation of *CALPAIN5* expression by *HOXA10* and the aberrant expression of *CALPAIN5* in reproductive disorders, including both endometriosis and pre-eclampsia. This is the first report of the expression of this molecule in the reproductive tract and the first time that this molecule has been linked to a disease state in any organ system.

Material and Methods

Tissue Collection

Ten endometrial biopsies (five proliferative phase and five secretory phase) were obtained from fertile women as controls. Histologically confirmed biopsies of endometriosis were obtained from ten women at the time of laparoscopy. All women were in the reproductive age, had regular menstrual cycles, and were not using hormonal medication within three months of surgery. Five 1st trimester decidual samples were obtained at the time of elective pregnancy termination. Five third trimester decidual samples were obtained from normotensive controls and five from women with pre-eclampsia at time of cesarean section. Written informed consent was obtained from all participants. Approval was obtained from the Yale University School of Medicine Human Investigations Committee.

Plasmids and siRNA

HOXA10 cDNA was cloned into the EcoRI site of pcDNA3.1(+) (Invitrogen, CA). pcDNA3.1(+) without the *HOXA10* insert was used as a control (Invitrogen). SiGenome duplex *HOXA10* siRNA (cat# B-002000-UB-015) and control non-targeting siRNA (cat# D-001210-02) were purchased from Dharmacon.(Dharmacon, IL).

Cell culture

The human endometrial stromal cells line HESC, human endometrial adenocarcinoma cell line Ishikawa and primary human decidual cells were generous gifts of Charles J. Lockwood, Richard Hochberg and Susan Richmond, respectively (all of Yale University). HESC, human decidual cells and Ishikawa cells were maintained in a phenol-red-free DMEM, Ham's F-12

and MEM, respectively (Sigma, St. Louis, MO). Each was supplemented with 10% charcoal-stripped calf serum, 1% penicillin/ streptomycin, and 1% sodium pyruvate

Transient transfection of human cell lines

HESC, grown to 60–70% confluence, were transfected using TransIT-LT1 Mirus (Madison, WI) with either pcDNA3.1(+)/*HOXA10* (0.4 µg for 6-well plates, 12 µg for 10cm dish) or *HOXA10* siRNA (20 µM for 6-well plates, 60 µM for 10cm dish), using empty pcDNA3.1(+) or non-specific siRNA as respective control. Ishikawa, grown to 45-55% confluence, were transfected using lipofectimine 2000 (Invitrogen, CA) with either pcDNA3.1(+)/*HOXA10* (0.4 µg for 6-well plates, 12 µg for 10cm dish) or *HOXA10* siRNA (20 µM for 6-well plates, 60 µM for 10cm dish), using empty pcDNA3.1(+) or non-specific siRNA as respective controls. Forty eight hours post-transfection, total RNA were isolated. All transfection experiments were conducted in triplicate.

Real-time RT-PCR

Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) was performed using the Lightcyle SYBR Green RT-PCR kit from Roche. 1 µg of total RNA was reverse transcribed in 20 µl of reaction mixture containing 10mM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP; 20 pmol oligo(dT); 40U/µl ribonuclease inhibitor, 10U/µl avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase and 10X AMVRT buffer for 30 min at 61°C. PCR amplifying *HOXA10* was performed for 45 cycles of 95°C for 2 sec; 65°C for 5 sec; 72°C for 18sec. PCR amplifying β -actin as a control was performed for 45 cycles of 95°C for 2 sec; 61°C for 5 sec; 72°C for 18sec. PCR amplifying CALPAIN5 was performed for 45 cycles of 95°C for 2 sec; 65°C for 5 sec; 72°C for 18 sec. The *HOXA10* and CALPAIN5 intron spanning primers were selected using the primer

selection program Primer3 developed by the Whitehead Institute for Biomedical Research. The primers selected yield a 211 bp reaction product from mRNA, and a 1389 bp DNA reaction product from DNA, which allowed control for possible DNA contamination.

HOXA10:

Sense: 5'-GCCCTTCCGAGAGCAGCAAAG-3',

Antisense: 5'-AGGTGGACGCTGCGGCTAATCTCTA-3'

Calpain5:

Sense: 5'-ACGGTGAGTTCTGGATGACC - 3`

Antisense: 5`-CTGTGGGTTCTGGAAGAAGG- 3`

The Roche Light Cycler monitored the increasing fluorescence of PCR products during amplification. A quantitative standard curve was then created. Quantitation of samples were determined with the Roche Light Cycler and adjusted to the quantitative expression of β -actin from these same samples. Melting curve analysis was conducted to determine the specificity of the amplified products and to insure the absence of primer-dimer formation. All products obtained yielded the predicted melting temperature. Three independent experiments were conducted at each concentration.

Immunohistochemistry

CALPAIN5 were evaluated by immunohistochemistry using a rabbit polyclonal antibody to CALPAIN5 (Triple Point Biologics, inc.). The specimens were embedded in paraffin and serial 5-mm sections obtained. The sections were deparaffinized in xylene and ethanol. Endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂. After a 45-min incubation with 1.5% normal goat blocking serum, the sections were incubated overnight at 4° C with primary antibody (anti-calpain5 1:3000). The sections were then incubated with biotinylated goat

antirabbit secondary antisera for 60 min, avidin and biotinylated peroxidase (Vectastain; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 45 min and diaminobenzidine (400 mg/ml) for 45 sec. Hematoxylin and Li_2CO_3 were used for counterstaining. One hundred consecutive cells in five nonadjacent microscopic fields were evaluated for staining to quantify the expression of each cell-type specific marker.

H score

Analysis of immunohistochemical staining was performed by a semiquantitative method incorporating both the number of staining cells and the intracellular staining intensity: the H score.(8,9) The intensity of staining was characterized as no staining (0), weak but detectable (1), distinct (2), or very strong (3). The H score was calculate by $H = \sum P_i x i$, where P_i is the percentage of stained cells in each intensity category, and i is the intensity score (0, 1, 2, or 3). The endometrial glandular epithelium and endometrial stroma were individually analyzed for the percentage of cells in each staining category to obtain an aggregate H score for each tissue. Analysis was performed by two independent observers.

Statistics

Quantitative PCR results were compared using t test. H scores were compared using ANOVA on ranks with post hoc test to distinguish individual differences.

Results

CALPAIN5 is expressed in human endometrium and decidua.

In normal human endometrium, immunohistochemistry demonstrated that CALPAIN5 was expressed in endometrial glandular epithelial cells and stromal cells throughout the menstrual cycle (Figure 1A-C). CALPAIN5 expression was localized within the cytoplasm of stromal cells and endometrial glandular epithelial cells. No significant variation was observed in CALPAIN5 expression throughout the menstrual cycle in either glands or stroma. Figure 2 demonstrates the average H score was slightly decreased, but not significantly in both cell types in the secretory phase.

CALPAIN5 expression persisted in the decidua of pregnancy.

Both first and third trimester decidua continued to demonstrate high levels of CALPAIN5 expression (Figure 3A-B). However, CALPAIN5 protein expression was higher in first trimester decidua than third trimester. (Figure 4) CALPAIN5 was also more highly expressed in first trimester decidua compared to proliferative or secretory phase endometrium.

CALPAIN5 Expression is Regulated by HOXA10

To determine if *CALPAIN5* was regulated by *HOXA10*, we performed transient transfection with a *HOXA10* expression construct or *HOXA10* siRNA. Successful transfection and increased/decreased *HOXA10* expression was confirmed using the real-time PCR (Figure 5). Real-time PCR demonstrated that pcDNA3.1/*HOXA10* transfection increased CALPAIN5 mRNA expression 11 fold compared to that obtained using empty pcDNA as a control in HESC ($P < 0.05$). CALPAIN5 mRNA expression was decreased 23-fold after *HOXA10* siRNA

transfection compared to control siRNA transfection in HESC ($P < 0.05$). *CALPAIN5* was regulated by *HOXA10* in stromal cells. Transfection with either pcDNA3.1/*HOXA10* or *HOXA10* siRNA did not alter *CALPAIN5* expression in Ishikawa cells suggesting that *CALPAIN5* was not regulated by *HOXA10* in glandular epithelium.

***CALPAIN5* expression was decreased in endometriosis and increased in preeclampsia.**

CALPAIN5 expression appeared decreased in the ectopic endometrium obtained from women with endometriosis. (Figure 1D) Immunohistochemistry results were quantified using the H score results. Results obtained using endometrium from normal fertile controls was compared to those obtained from women with the diagnosis of either endometriosis or preeclampsia. In the eutopic endometrium of women with endometriosis there was a significant decrease in *CALPAIN 5* protein expression compared to fertile controls ($P < 0.05$). Similarly in the ectopic endometriosis there was an equivalent decrease in *CALPAIN5* expression in both stromal and glandular cells; levels of *CALPAIN 5* expression in either the eutopic or ectopic endometrium were approximately 50% of that seen in fertile controls (Figure 6).

In the third trimester decidua, *CALPAIN5* was expressed at significantly higher levels in tissue obtained from subjects with the diagnosis of pre-eclampsia than in decidua from normotensive uncomplicated pregnancies ($P < 0.05$) (Figure 2C). *CALPAIN5* expression was increased to approximately 20% compared to that seen in the decidua of controls. (Figure 7) The expression of *CALPAIN5* was also noted in vascular endothelial cells in this tissue. *CALPAIN 5* expression was altered in both of these conditions associated with abnormal function of this tissue.

Discussion

CALPAIN5 is a member of the cytoplasmatic cysteine protease family, a group of Ca^{2+} regulated enzymes. The calpain family has four members whose functions are not well characterized. Calpains in general, and in particular *CALPAIN5*, have been implicated in multiple cellular processes including cell differentiation and apoptosis.(1) Two observations that have implicated CALPAIN in apoptosis include the expression of CALPAIN during the cell death and the inhibition of apoptosis by various CALPAIN inhibitors.(10) CALPAINs has been implicated in the activation of caspase-induced apoptosis in neurons, breast and ovary.(10,11) However, CALPAINs have also been demonstrated to have an unusual role in the activation of caspase-independent apoptosis during platelet activation.(12) Mitochondria are believed to have an important role in CALPAIN activation of caspase-independent pathway by the release of apoptosis inducing factor (AIF).(13) Caspase-independent apoptosis pathways are important mechanisms for triggering a response to cytotoxic agents or other death stimuli when the caspase-mediated routes fail.(13) *CALPAIN5* (also known as htrg3) is a human tissue-specific calpain highly homologous to *Caenorhabditis elegans* tra-3 *CALPAIN5* is expressed in multiple human tissues, including the uterus and placenta.(14) The exact function of *CALPAIN5* in these tissues is not known. *CALPAIN5* is highly conserved between human and mice - 87% at the mRNA and 95% at the protein level. In murine models *CALPAIN5* expression is low in the uterus before pregnancy, but increases during the ongoing gestation, particularly in decidual cells.(15) The decidual cells are the only cells that express *CALPAIN5* in mice during early and late pregnancy. These observations are consistent with ours results that showed *CALPAIN5* expression in humans during the first and third trimesters.

Here we showed that *CALPAIN5* is expressed in human endometrial stromal cells during the menstrual cycle. *HOXA10* regulated *CALPAIN5* expression in stroma and decidua. Epithelial cell expression is present but not as highly regulated due to the limited role of these cells in later pregnancy, including lack of contribution to decidua. A cell type specific cofactor likely interferes with epithelial *CALPAIN5* regulation in the secretory phase.(16) These results differ slightly from those of Nie et al. (2006) who found increased *CALPAIN5* expression during the later phases of the estrous cycle in the mouse however decidualization occurs earlier in mouse than in human.(16) The earlier increase in mouse may reflect the relative earlier decidualization in this species. Similar to the mouse, human *CALPAIN5* showed a significant increase in expression in first trimester decidua when compared with phases of the menstrual cycles.(15) In both species, the stromal cell increase in *CALPAIN5* expression is temporally and cellularly correlated with *HOXA10* expression.

HOXA10 is essential for embryonic uterine development and persists in the adult uterus where it is necessary for the implantation process.(17-19) The function of *HOXA10* in the uterus is well defined; however, the molecular mechanism underlying these actions are poorly understood. *HOXA10* is a transcription factor that regulates a battery of target genes. These include genes that are important for decidualization including IGF-binding protein 1 (IGFBP-1) *EMX2* and prolactin.(20-24) The molecular mechanism by which *HOXA10* directs endometrial receptivity and decidualization include the regulation of *CALPAIN5* in human endometrial stromal cells. This in turn regulates apoptosis of the endometrium in response to decidualization and pregnancy.

Here we showed decreased levels of *CALPAIN5* expression in endometrium from patients with endometriosis. Endometriosis is characterized by the presence of endometrium outside of the uterine cavity. The most widely accepted theory for the etiology of endometriosis is retrograde menstruation and perpetuation of the endometrial tissue in ectopic locations.(25) The pathogenesis of the disease is tied with the uncontrolled proliferation and decreased cell death. An increase in cell proliferation without equal apoptosis has been described in the endometrium of women with endometriosis.(26). One function of the CALPAIN family is to regulate apoptosis; Calpains can activate both caspase dependent and caspase independent pathways. The action of *CALPAIN5* in the endometrium is likely related to the regulation of apoptosis. We hypothesize that CALPAIN is a molecular mediator through which *HOXA10* controls apoptosis in the normal endometrium. *HOXA10* expression is decreased in ectopic and eutopic endometrium from women with endometriosis, which in turn leads to reduced expression of *CALPAIN5*.(27,28) The decreased expression of *CALPAIN5* in endometriosis likely limits apoptosis and promotes the perpetuation of this tissue in ectopic locations.(29) Moreover, the lower expression of *CALPAIN5* in eutopic tissue and consequent decrease of apoptosis may be related to the reduction in endometrial receptivity and fertility seen in this disease.

While several proteins play an important role in the human placentation, the molecular components involved are not fully characterized. Little information is known about the molecular changes underlying diseases such as spontaneous abortion and pre-eclampsia.(30) The most important adaptation during the pregnancy is the invasion by the cytotrophoblast, through the full thickness of the decidua, in particular the maternal decidual vasculature.(30) The failure of cytotrophoblast invasion and inappropriate spiral artery transformation is the characteristic of pre-eclampsia.(31) During cytotrophoblast invasion into the decidua,

apoptosis plays an essential role in facilitating the process. Deficient apoptosis may alter the ability of decidua to support invading trophoblasts and allow apposition to the menstrual vasculature. Other genes have been implicated in the regulation of apoptosis during the invasion; decidual aspartyl protease 1 (DAP-1) has been associated with pre-eclampsia through the regulation of the caspase -2 gene during the invasion process.(32) We hypothesize that *CALPAIN5* can drive apoptosis by both the caspase-dependent and caspase-independent pathways in both decidua and uterine vasculature. The increased expression of *CALPAIN5* in pre-eclampsia may lead to defective tissue remodeling and endothelial dysfunction. The latter may be both through an effect on decidual cells or directly due to altered *CALPAIN5* expression in the vascular endothelium.

Recently it was reported that patients with endometriosis have a significantly lower risk of pre-eclampsia than women without endometriosis.(33) The odds of women with endometriosis developing pre-eclampsia are approximately five times less than patients without endometriosis. The aberrant regulation of *CALPAIN5* and its action on apoptosis is a novel molecular mechanism linking the development of endometriosis with a the lower risk of pre-eclampsia.

In conclusion, we report for the first time the expression and molecular regulation of *CALPAIN5* in human endometrium and decidua. *CALPAIN5* is regulated by *HOXA10* in the endometrial stroma/decidua. Aberrant expression of *CALPAIN5* is associated with two different endometrial diseases - endometriosis and pre-eclampsia. Further, this common aberration may elucidate the molecular mechanism by which pre-eclampsia and endometriosis are linked. Women with a diagnosis of endometriosis are less likely to develop preeclampsia, correlating with the opposite regulation of *CALPAIN5* in these two conditions.

References

1. **Koichi S, Kawabata Y, Sorimachi H** 2004 Structure, activation and biology of Caplain. *Diabetes Care* 53:s12-s18
2. **Syntichaki P, Xu K, Driscoll M, Tavernarakis N** 2002 Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature* 419:939-944
3. **Gonzalez A, Saez ME, Aragon MJ, Galan JJ, Vettori P, Molina L, Rubio C, Real LM, Ruiz A, Ramirez-Lorca R** 2006 Specific haplotypes of the CALPAIN-5 gene are associated with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 21:943-951
4. **Du H, Vitiello D, Taylor H** 2005 Microarray identification of HOXA10 target genes. Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation Abstract # 389.
5. **Bagot CN, Troy PJ, Taylor HS** 2000 Alteration of maternal Hoxa10 expression by in vivo gene transfection affects implantation. *Gen Ther* 7:1378-1384
6. **Taylor HS, Arici A, Olive D, Igarashi P** 1998 HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest* 101:1379-1384
7. **Sarno JL, Kliman HJ, Taylor HS** 2005 HOXA10, Pbx2, and Meis1 protein expression in the human endometrium: formation of multimeric complexes on HOXA10 target genes. *J Clin Endocrinol Metab* 90:522-528
8. **Budwit-Novotny DA, McCarty KS, Cox EB, Soper JT, Mutch DG, Creasman WT, Flowers JL, McCarty KS, Jr.** 1986 Immunohistochemical analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody. *Cancer Res* 46:5419-5425

9. **Lessey BA, Killam AP, Mezger DA, Haney AF, Greene GL, McCarthy KS** 1988 Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle and the menopause. *J Endocrinol Metab* 67:334-340
10. **Bao J J, Le XF, Wang RY, Yuan J, Wang L, Atkinson EN, LaPushin R, Andreeff M, Fang B, Yu Y, Bast RC Jr.** 2002 Reexpression of the tumor suppressor gene ARHI induces apoptosis in ovarian and breast cancer cells through a caspase-independent calpain-dependent pathway. *Cancer Res* 62:7264-7272
11. **Bozyczko-Coyne D, O'Kane TM, Wu ZL, Dobrzanski P, Murthy S, Vaught JL, Scott RW** 2001 CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of SAPK/JNK pathway activation, promotes survival and blocks multiple events associated with Abeta-induced cortical neuron apoptosis. *J Neurochem* 77:849-863
12. **Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJ, Louwes H, Esselink MT, Smit JW, Vellenga E, de Wolf JT** 2005 Increased peripheral platelet destruction and caspase-3-independent programmed cell death of bone marrow megakaryocytes in myelodysplastic patients. *Blood* 105:3472-3479
13. **Artus C, Maquarre E, Moubarak RS, Delettre C, Jasmin C, Susin SA, Robert-Lezenes J** 2006 CD44 ligation induces caspase-independent cell death via a novel calpain/AIF pathway in human erythroleukemia cells. *Oncogene* 25:5741-5751
14. **Waghray A, Wang DS, McKinsey D, Hayes RL, Wang KK** 2004 Molecular cloning and characterization of rat and human calpain-5. *Biochem Biophys Res Commun* 324:46-51
15. **Nie GY, Li Y, Minoura H, Batten L, Ooi GT, Findlay JK, Salamonsen LA** 2003 A novel serine protease of the mammalian HtrA family is up-regulated in mouse uterus coinciding with placentation. *Mol Hum Reprod* 9:279-290

16. **Taylor HS** 2002 Transcriptional regulation of implantation by HOX genes. *Rev Endocr Metab Disorders* 3:127-132
17. **Benson GV, Lim H, Paria BC, Satokata I, Dey SK, Maas RL** 1996 Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* 122:2687-2696
18. **Block K, Kardana A, Igarashi P, Taylor HS** 2000 In utero diethylstilbestrol (DES) exposure alters Hox gene expression in the developing mullerian system. *FASEB J* 14:1101-1108
19. **Satokata I, Benson G, Maas R** 1995 Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10 deficient mice. *Nature* 374:460-463
20. **Daftary GS, Troy PJ, Bagot CN, Young SL, Taylor HS** 2002 Direct regulation of Beta-3 integrin subunit gene expression by HOXA10 in endometrial cells. *Mol Endocrinol* 16:571-579
21. **Kim JJ, Taylor HS, Lu Z, Ladhani O, Hastings JM, KS. J, Wu Y, Guo SW, Fazleabas AT** 2007 Altered expression of HOXA10 in endometriosis: potential role in decidualization. *Mol Hum Reprod* 13:323-332
22. **Troy PJ, Daftary GS, Bagot CN, Taylor HS** 2003 Transcriptional repression of peri-implantation EMX2 expression in mammalian reproduction by HOXA10. *Mol Cell Biol* 23:1-13
23. **Daftary GS, Taylor HS** 2004 Pleiotropic effects of Hoxa10 on the functional development of peri-implantation endometrium. *Mol Reprod Dev* 67:8-14
24. **Fei X, Chung H, Taylor HS** 2005 Methoxychlor disrupts uterine Hoxa10 gene expression. *Endocrinology* 146:3445-3451

25. **Sampson JA** 1924 Benign and malignant endometrial implants in peritoneal cavity, and their relation to certian ovarian tumors. Surg Gynecol Obstet 38:287-311
26. **Wingfield M, Macpherson A, Healy DL, Rogers PA** 1995 Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. Fertil Steril 64:340-346
27. **Browne H, Taylor H** 2006 HOXA10 expression in ectopic endometrial tissue. Fertil Steril 85:1386-1390
28. **Taylor HS, Bagot C, Kardana A, Olive DL, Arici A** 1999 HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. Hum Reprod 14:1328-1331
29. **Lee WK, Abouhamed M, Thevenod F** 2006 Caspase-dependent and -independent pathways for cadmium-induced apoptosis in cultured kidney proximal tubule cells. Am J Physiol Renal Physiol 291:F823-832
30. **Cross JC, Werb Z, Fischer SJ** 1994 Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. Science 266:1508-1518.
31. **Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ** 1997 Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? J Clin Invest 99:2152-2164
32. **Moses EK, Freed KA, Higgins JR, Brennecke SP** 1999 Alternative forms of a novel aspartyl protease gene are differentially expressed in human gestational tissues. Mol Hum Reprod 5:983-989
33. **Brosens IA, De Sutter P, Hamerlynck T, Imeraj L, Yao Z, Cloke B, Brosens JJ, Dhont M** 2007 Endometriosis is associated with a decreased risk of pre-eclampsia. Hum Reprod 22:1725-1729

Figure Legends:

Figure 1. IHC demonstrating expression of CALPAIN5 in the female reproductive tract. A) Negative Control, B) Proliferative endometrium, C) Secratory endometrium, D) Endometriosis.

Figure 2 CALPAIN5 expression in endometrial stromal cells and glands in proliferative and secretory endometrium as determined by IHC and H score.

Figure 3. CALPAIN5 expression in preganancy. A) 1st trimester decidua, B) 3rd trimester decidua, C) Representative 3rd trimester decidua from subjects with pre-eclampsia

Figure 4. CALPAIN5 expression in 1st trimester decidua compared to secretory endometrium as determined by IHC and H score.

* $P < 0.05$

Figure 5- Results of CALPAIN5 and HOXA10 expression after transient transfection of HESC with pcDNA/HOXA10 or pcDNA/control (1) and with siRNA/HOXA10 and siRNA/Control (2).

* $P < 0.05$

CALPAIN 5 expression is increased and decreased in parallel to alteration in HOXA10 expression.

Figure 6- CALPAIN5 protein expression in stromal cells and glands in eutopic endometrium of controls and ectopic endometrium of endometriosis patients. * $P<0.05$

Figure 7- CALPAIN5 expression in 3rd trimester decidua from patients with pre-eclampsia and controls . $P<0.05$

Figure 1. IHC demonstrating expression of CALPAIN5 in the female reproductive tract. A) Negative Control, B) Proliferative endometrium, C) Secretory endometrium, D) Endometriosis.

Figure 2 CALPAIN5 expression in endometrial stromal cells and glands in proliferative and secretory endometrium as determined by IHC and H score.

Figure 3. CALPAIN5 expression in pregnancy. A) 1st trimester decidua, B) 3rd trimester decidua, C) Representative 3rd trimester decidua from subjects with pre-eclampsia.

Figure 4. CALPAIN5 expression in 1st trimester decidua compared to secretory endometrium as determined by IHC and H score.

* P<0.05

Figure 5- Results of CALPAIN5 and HOXA10 expression after transient transfection of HESC with pcDNA/HOXA10 or pcDNA/control (1) and with siRNA/HOXA10 and siRNA/Control (2).

* $P < 0.05$

CALPAIN 5 expression is increased and decreased in parallel to alteration in HOXA10 expression.

Figure 6- CALPAIN5 protein expression in stromal cells and glands in eutopic endometrium of controls and ectopic endometrium of endometriosis patients. * $P < 0.05$

Figure 7- CALPAIN5 expression in 3rd trimester decidua from patients with pre-eclampsia and controls . $P < 0.05$

ANEXO A – Cultura de Células

1- Células Endometriais Estromais Humana

1.1- Meio de cultura

1.1.1- Colocar 600 ml de água destilada em um vidro de 1000ml.

1.1.2- Colocar para misturar a solução.

1.1.3- 1g de F12 HAM (Meio de cultura modificado Eagles)-

Importante esse e apenas para descongelar, pois tem fenol que estimula os receptores de estrogênio, na troca de meio colocar o sem fenol-

Porém se você for fazer transfection não importa

1.1.4- Aguardar uns 10 minutos enquanto mistura.

1.1.5- Adicionar 10ml/l de Piruvato de sódio

1.1.6- 2,2g de Bicarbonato de sódio

1.1.7- Aguardar 10 minutos enquanto mistura.

1.1.8- Ajustar o pH***.

1.1.9- Ajustar a medida para 900ml com água destilada.

1.1.10- Colocar 100ml de FBS 50/50 colf/FBS

1.1.11- Colocar 5 ml de pré-strept (antib) e 5ml de amphotericina B ou colocar α -biotic e α -mycotic.

1.1.12- Ir para o HOOD e usar o filtro especial e colocar o meio de cultura na parte superior depois usar a mangueira de aspiração ligada ao filtro.

***Obs: Ajustar pH: O pH ótimo e entre 7.2 e 7.25.

1.2- Preparação do meio tampão

Em uma garrafa graduada de 1litro, colocar 1litro de água destilada e 5 tabletes de substância tampão de fosfato salino.

Na capela, após a limpeza local e da garrafa graduada com álcool 70%, promover a filtração da substância com o filtro de micropore.

A substância formada identificar e guardar em área refrigerada a – 4° C.

1.3- Procedimento inicial

Iniciar levando o meio de cultura para o banho-maria, deixe por 10 minutos a uma temperatura de 37°C.

Antes de iniciar quaisquer procedimentos na capela, verifique se o vácuo está funcionando. Troque a luz ultravioleta por luz branca indireta e ligue o sistema de filtragem. Colocar uma luva de procedimento e limpe toda a superfície da capela com álcool 70%.

Iniciar a partir de células congeladas: Retirar do freezer -80° C uma amostra de células endometriais estromais humanas presente em um dos frascos com identificação. Fazer o transporte entre o freezer e a capela por meio de isopor com gelo. Colocar o frasco contendo as células em banho-maria por 2 minutos a 37° C. Ao entrar na sala da capela, trocar as luvas e lavar as mãos com álcool 70%. Ligar a capela e lavar com álcool o frasco contendo o meio de cultura para células estromais. Utilizar um frasco de Falcon de 50ml, com filtro de tampa. Nesse frasco pipetar 4ml de meio de cultura, após pipetar o conteúdo do frasco com as células. Fechar o frasco de Falcon colocá-lo na posição horizontal (com o lado áspero para baixo) e colocá-lo na incubadora com CO₂ e temperaturas ótimas.

Após 24 horas da preparação da cultura, avaliar o crescimento e a confluência das células estromas no microscópio invertido.

Trocar o meio de cultura a cada 48 horas, se a confluência chegar a 70% deve-se proceder a divisão desse frasco em 2 outros.

1.4- Divisão e preparação de placas de semeadura

Para o procedimento de transfecção inicialmente dividir as células dentro dos poços presentes nas placas de cultura.

Descongelar em banho-maria (37° C) a enzima tripsina.

Na capela, após todos os procedimentos de segurança já citados, aspirar o meio de cultura dos frascos de Falcon. Injetar então 4ml de substância tampão, para que se remova todos os traços do meio de cultura.

Aspirar toda a substância tampão. Colocar agora no frasco 2ml de tripsina. Colocar o frasco de volta na incubadora por 3 minutos coloque-o na posição horizontal.

Com o microscópio invertido observar se as células estão flutuando na tripsina. Se não estiverem retornar com o frasco para a incubadora e aguardar mais 1 minuto. Não deixe as células ficarem na tripsina por mais de 6 minutos, pois isso causará danos à parede celular favorecendo o processo de crenação.

Uma vez que as células estejam flutuando, injetar 4ml de meio de cultura para células endometriais estromais; com isso ocorrerá a inativação da tripsina.

Agora com a placa de cultura com os 6 poços colocar 1ml do conjunto de células, tripsina e meio de cultura em cada poço. Somado a isso colocar mais 0,5ml de meio de cultura.

Devolver a placa de cultura a incubadora e aguarde até que haja 70% de confluência para realização da transfecção.

2- Células epiteliais endometriais humanas (Células Ishikawa).

1.1- Meio de Cultura

1.1.1- Colocar 600 ml de água destilada em um vidro de 1000ml.

1.1.2- Colocar para misturar a solução.

1.1.3- 1g de MEM (meio de cultura mínimo essencial)- Importante esse e apenas para descongelar, pois tem fenol que estimula os receptores de estrogênio, na troca de meio colocar o sem fenol- Porém se você for fazer transfecção não importa

1.1.4- Aguardar uns 10 minutos enquanto mistura.

1.1.5- Adicionar 10ml/l de Piruvato de sódio

1.1.6- 2,2g de Bicarbonato de sódio

1.1.7- Aguardar 10 minutos enquanto mistura.

1.1.8- Ajustar o pH***.

1.1.9- Ajustar a medida para 900ml com água destilada.

1.1.10- Colocar 100ml de FBS 50/50 colf/FBS

1.1.11- Colocar 5 ml de pré-strept (antib) e 5ml de amfotericina B ou colocar α -biotic e α -mycotic.

1.1.12- Ir para a capela e usar o filtro especial e colocar o meio de cultura na parte superior depois usar a mangueira de aspiração ligada ao filtro.

***Obs: Ajustar pH: O pH ótimo e entre 7.2 e 7.25.

1.2- Preparação inicial

Antes de iniciar quaisquer procedimentos na capela, verificar se o vácuo esta funcionando. Trocar a luz ultravioleta por luz branca indireta, liguar o sistema de filtragem, colocar uma luva de procedimento e limpar todas a superfície da capela com álcool 70%.

Iniciar a partir de células congeladas: Retirar do freezer -80°C uma amostra de células endometriais estromais humanas presente em um dos frascos com identificação. Fazer o transporte entre o freezer e a capela por meio de isopor com gelo. Colocar o frasco contendo as células em banho-maria por 2 minutos a 37° C. Ao entrar na sala da capela, trocar as luvas, lavar as mãos com álcool 70%. Ligar a capela, lavar com álcool o frasco contendo o meio de cultura para células estromais.

Utilizar um frasco de Falcon de 50ml, com filtro de tampa. Nesse frasco pipetar 4ml de meio de cultura, após pipetar o conteúdo do frasco com as células. Fechar o frasco de Falcon colocá-lo na posição horizontal (com o lado áspero para baixo) e colocá-lo na incubadora com CO₂ e temperaturas ótimas.

Após 24 horas da preparação da cultura, avaliar o crescimento e a confluência das células estromas no microscópio invertido.

Trocar o meio de cultura a cada 48 horas. Se a confluência chegar a 60% deve-se proceder a divisão desse frasco em 2 outros.

1.3- Divisão e preparação de placas de semeadura

Para o procedimento de transfecção inicialmente dividir as células dentro dos poços presentes nas placas de cultura.

Descongelar em banho-maria (37° C) a enzima tripsina.

Na capela, após todos os procedimentos de segurança já citados, aspirar o meio de cultura dos frascos de Falcon. Injetar então 4ml de substância tampão, para que se remova todos os traços do meio de cultura.

Aspirar toda a substância tampão. Coloque agora no frasco 2ml de tripsina. Coloque o frasco de volta na incubadora por 3 minutos, coloque-o na posição horizontal.

Com o microscópio invertido observar se as células estão flutuando na tripsina.

Se não estiverem, retornar com o frasco para a incubadora e aguardar mais 1 minuto. Não deixe as células ficarem na tripsina por mais de 6 minutos, pois isso causará danos à parede celular favorecendo o processo de crenação.

Uma vez que as células estejam flutuando, injete 4ml de meio de cultura para células endometriais estromais; com isso ocorrerá a inativação da tripsina.

Agora com a placa de cultura com os 6 poços colocar 1ml do conjunto de células, tripsina e meio de cultura em cada poço. Somado a isso, colocar mais 0,5ml de meio de cultura.

Devolva a placa de cultura à incubadora e aguarde até que haja 60% de confluência para realização da transfecção.

ANEXO B – Transfecção genética

1.- Preparação do meio de cultura para transfecção (Todo o procedimento deve ser realizado na capela)

Para as células estromais endometriais usar o TransIT® e para células Ishikawa o lipofectime2000®.

1.1- Orientações iniciais básica:

- 1.1.1- Meio de cultura – Utilizar para a transfecção um meio de cultura sem serum, sendo que o mesmo deve ser trocado após 4 horas da transfecção.
- 1.1.2- Confluência celular para realizar o procedimento de 50-70%.
- 1.1.3- O DNA utilizado para a transfecção deve ser extremamente purificado, estéril e sem qualquer contaminação de endotoxinas.
- 1.1.4- O tempo ideal de incubação da transfecção genética é de cerca de 24 a 48 horas.

1.2- Formação da substância de transfecção:

- 1.2.1- Aproximadamente 24 horas antes da transfecção, semear os poços da placa de cultura com as células. Esse procedimento é essencial para que no dia da transfecção haja uma confluência de 50-70%. Deixar a placa incubada durante a noite.
- 1.2.2- Num tubo de ensaio estéril adicionar 200 microlitros de meio de cultura sem serum. Nesse mesmo tubo adicionar o agente de transfecção (na proporção de 3-7 microlitros por microgramas de DNA). Mexer gentilmente e deixar incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.

1.2.3- Adicionar agora o DNA (ex. *HOXA10*/pcDNA) na proporção de 1 a 3 microgramas por amostra. Adicione-o no tubo de ensaio onde foi introduzido o agente de transfecção. Mexer gentilmente e incube na temperatura ambiente por 15 minutos. OBS: O número de tubos de ensaio será diretamente proporcional ao número de grupos de estudo do trabalho e conseqüentemente o número de poços nas placas de cultura.

1.3- Procedimento para a transfecção:

- 1.3.1- Na placa de cultura que ficou encubada durante 24 horas, retirar o meio de cultura regular (com serum) e usando a substância tampão lavar os poços da placa.
- 1.3.2- Aspirar e descartar a substância tampão dos poços da placa de cultura.
- 1.3.3- Agora adicionar em cada poço toda a substância formada no ítem 1.2.3, mexer gentilmente para frente e para trás. Incubar, em ambiente controlado de CO₂, luz e temperatura por 4 horas.
- 1.3.4- Após 4 horas aspirar e descartar a substância de transfecção de cada poço. Trocar por meio de cultura com serum e incube novamente por 48 horas.

Material & Métodos: Transfecção

Ishikawa Cels & HESC

Cel- Um poço foi mantido apenas com células e meio de cultura. Essa amostra é considerada o controle geral de todas as outras transfeções.

Reag- Um poço com reagente de transfecção. Nessa amostra colocamos as células com o agente transfecção. Utilizamos essa estratégia para avaliarmos se o próprio agente de transfecção não seria um fator de morte celular e conseqüentemente veis do estudo.

pcDNA- O plasmídeo sem o DNA de ativação do *HOXA10*. Essa amostra é o controle do pcDNA/*HOXA10*, onde tem-se o complexo agente de transfecção/pcDNA.

pcDNA/*HOXA10*- O plasmídeo contendo promotor da expressão do DNA. Nessa amostra introduzimos nas células o promotor da expressão do *HOXA10*, por meio do complexo agente de transfecção/pcDNA/*HOXA10*.

siRNA/*HOXA10* - O RNA pequeno de interferência é utilizado para “silenciar” a expressão gênica atuando no RNA mensageiro. Essa amostra tem o complexo agente de transfeção/siRNA/*HOXA10*.

siRNA controle- Utiliza-se para se comparar os resultados do siRNA/*HOXA10*. Essa amostra tem o complexo agente de transfeção/siRNA/*HOXA10*.

ANEXO C – Extração do RNA

1- Retirada das células: (Qiagen)

- 1.1- Iniciar colocando a tripsina no banho-maria, identificando os tubos de 15ml que irão receber as paletas de células e preparando um recipiente com gelo onde esses tubos ficarão.
- 1.2- Após 48 horas de transfecção, retirar a placa de cultura da incubadora.
- 1.3- Na capela aspirar e descartar o meio de cultura dos poços. Usando a substância tampão, lavar as células realizando movimentos gentis. Aspirar e descartar a substância tampão.
- 1.4- Adicionar 0,5 ml de tripsina por poço. Colocar a placa na incubadora por 3 minutos.
- 1.5- Retirar a placa da incubadora e observar no microscópio invertido se as células estão flutuando.
- 1.6- Adicionar 1ml de meio de cultura para tamponar a ação da tripsina.
- 1.7- Aspirar o volume 1,5ml formado e adicione-o no tubo de ensaio de 15ml que está no recipiente com gelo. Repetir isso para cada grupo.
- 1.8- Centrifugar a 300g por 5 minutos. Aspirar o sobrenadante e deixe apenas a paleta de células. Depois colocar o tubo no recipiente com gelo.

2- Preparação da estrutura pré-procedimento de extração

- 2.1- Preparar o RLT tampão. Para isso, adicionar 10 microlitros de beta-mercaptoetanol para cada 1 ml do RLT tampão. Preparar em um tubo de ensaio à parte e utilize a capela de produtos químicos.
- 2.2- Na primeira vez de uso do kit da Qiagen, adicionar 4 volumes de ethanol (100%) no frasco do RPE tampão.

3- Procedimento de extração do RNA:

- 3.1- Pipetar 400 microlitros de tampão RLT para dentro dos tubos de ensaio. Com uma seringa e agulha de 21 gauge aspirar e injetar pelo menos 9 vezes para causar a fragmentação celular.
- 3.2- Depois, adicionar 300 microlitros de ethanol a 100% para o tubo de ensaio e mexa gentilmente.
- 3.3- Já no tubo de extração de RNA com a coluna de extração, pipetar 700 microlitros na coluna. Se sobrar volume, após a primeira microcentrifugação, repetir com a substância que sobrou. Agora centrifugar por 15 segundos com velocidade acima de 8000xg, descartar o líquido e manter a coluna e o tubo.
- 3.4- Adicionar agora 700microlitros de tampão RW1 na coluna de extração e centrifugar por 15 segundos com velocidade acima de 8000xg, descartar o líquido e mantenha a coluna e o tubo.
- 3.5- Troque de luvas. Adicionar 500 microlitros de tampão RPE na coluna de extração. Depois, centrifuge por 2 minutos com velocidade acima de 8000xg, descartar o líquido e mantenha a coluna e o tubo. Repetir esse procedimento novamente.
- 3.6- Colocar a coluna de extração de RNA num novo tubo de 1.5 ml. Adicionar 30 microgramas de água livre de RNA no centro da coluna. Obs: Colocar no centro da coluna, quanto menor o volume de água adicionado maior a concentração de RNA na substância formada. Centrifugar em velocidade máxima por 1 minuto.
- 3.7- Descartar a coluna de extração de RNA e mantenha o tubo de 1,5 ml com o RNA. Identifique-o e mantenha á – 80° C.

ANEXO D – Imunohistoquímica

1- Preparação das substâncias a serem utilizadas.

- 1.1- Tampão fosfato – 1L de água destilada com 5 tabletes de tampão de fosfato.
- 1.2- Tampão fosfato modificado – 1 L de água destilada com 5 tabletes de tampão de fosfato mais Tween.
- 1.3- Tampão de citrato- 1L de água destilada, 2,94g de citrato de sódio e manter o ph em 6.
- 1.4- Peróxido de hidrogênio a 3% - Usar o peróxido de hidrogênio a 30% e diluí-lo para 3%.
- 1.5- Soro de bloqueio a 1,5% - (Usar tampão fosfato modificado para diluir o soro específico de bloqueio – isso dependerá do seu anticorpo primário e secundário-)
- 1.6- Anticorpos primários e secundários – diluir na proporção ideal com o anticorpo.
- 1.7- ABC elite-10ml de tampão fosfato modificado mais 2 gotas A e 2 gotas B.
- 1.8- DAB - 3ml de água destilada com 2 gotas de solução específica de tampão e adicionar 4 gotas de solução de DAB e após, adicionar a solução de peróxido de hidrogênio.

2- Procedimento técnico

- 2.1- Retirar a parafina das lâminas. Realizar três banhos consecutivos em xilene de aproximadamente 10 minutos cada.

2.2 - Re-hidratação do tecido na lâmina. Iniciar com três banhos consecutivos de 10 minutos com álcool a 100%, depois de forma gradativa realizar banhos consecutivos com álcool a 95%, a 80% e 70% cada um com duração de 10 minutos. Obs: Quando iniciar o banho de 95% de álcool, colocar na geladeira outro recipiente com álcool a 95% para o processo de permeabilização.

2.3- Permeabilização. Utilizar o álcool 95% e fazer um banho de 10 minutos no refrigerador. Obs: Quando nesse ponto ligar o steamer.

2.4- Banho com água destilada por 5 minutos.

2.5- Captação dos antígenos – No steamer colocar um recipiente com tampão de citrato à 90°C por 20 minutos e depois deixar resfriar por mais 20 minutos.

2.6- Banho com tampão fosfato por 3 minutos.

2.7- Banho com o tampão fosfato modificado por 5 minutos.

2.8- Banho com peróxido de hidrogênio a 3% por 3 minutos.

2.9- Banho com tampão fosfato modificado por 3 minutos.

2.10- Solução de bloqueio a 1,5% (diluído em tampão fosfato modificado) pipetar sobre as lamínas e incubar na temperatura ambiente por 1 hora.

2.11- Sem lavar a solução de bloqueio, pipetar o anticorpo primário na concentração de 1/3000 e deixar incubar durante a noite na temperatura de 4°C.

2.12- Banho com tampão fosfato modificado por 5 minutos.

2.13- Colocar o anticorpo secundário na concentração de 1/500 e incubar na temperatura ambiente por 1 hora. Obs: 30 minutos após o início da incubação prepare o ABC elite.

2.14- Banho com tampão fosfato modificado por 5 minutos.

- 2.15- Marcação do anticorpo secundário. Pipetar o ABC elite sobre a lâmina e aguarde 15 minutos.
- 2.16- Colocar o DAB por 5 minutos.
- 2.17- Lavar com água destilada. Apenas lave.
- 2.18- Se sua proteína for encontrada no núcleo proceder a realização da hematoxilina. (nesse processo colocar cada lamina por 15 segundos na hematoxilina e depois lavar rápido com água destilada).
- 2.19- Fazer os passos contrários desde o álcool 75% até a xilene. Agora o período de banho é de cerca de 3 minutos.
- 2.20- Colocar a substância fixadora e lamínula. Aguardar 3 horas para observar ao microscópio.