Paula Beatriz Tavares Fettback

**Expressão qualitativa de genes relacionados à atividade de células tronco em
mulheres inférteis com endometriose peritoneal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Ginecologia

Orientador: Dr. Paulo César Serafini

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fettback, Paula Beatriz Tavares

Expressão qualitativa de genes relacionados à atividade de células tronco em
mulheres inférteis com endometriose peritoneal / Paula Beatriz Tavares Fettback.

-- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ginecologia.

Orientador: Paulo César Serafini.

Descritores: 1.Células-tronco 2.Endométrio 3.Endometriose 4.Expressão gênica

USP/FM/DBD-389/10

Dedicatória

Ao meu pai, Luiz Sérgio Fettback, o maior orgulho que tenho na vida.

A Edécio de Paula Filho, todo o meu amor. Por tudo.

À minha mãe Eneida Tavares de Lima Fettback, uma grande mulher.

Aos meus irmãos Roberta e Olavo Fettback

e à minha avó Liliana Tavares de Lima,
mesmo distante levo vocês sempre comigo.

Ao meu avô João Tavares de Lima, exemplo de determinação.

Agradecimentos

Ao Doutor Paulo Serafini, mestre e médico extraordinário.

Sua paixão pela medicina e pela ciência me torna, a cada dia, uma médica melhor.

Obrigada por jamais ter deixado de confiar e investir em mim.

Ao Doutor Ricardo Pereira, cirurgião inigualável e amigo fiel.

Obrigada pela confiança e respeito de sempre.

Ao Doutor Eduardo Motta, por todos os ensinamentos dos últimos anos.

Pelas excelentes sugestões nos exames de qualificação.

Pela honra de trabalharmos juntos.

Ao Professor Edmund Chada Baracat,

minhas sinceras admiração e gratidão.

Ao Doutor Gary Smith e ao Professor Timothy Johnson,

pela oportunidade de viver uma fantástica experiência

na Universidade de Michigan.

Ao Doutor André Monteiro da Rocha,

pelo apoio científico e paciência inesgotável.

À Jun Ding e Craig Johnson pela colaboração técnica e científica durante meu
aprendizado na Universidade de Michigan.

Aos meus amigos, colegas de trabalho e de vida,
Alysson Zanatta, Claudia Gomes, Thais Domingues, Paulo Bianchi,
Edward Carrilho, Eduardo Miyadahira, Mauro Bibancos,
Milton Reitzfeld e Jamil Fonseca.
Pelo apoio e amizade diários.

À Doutora Maricy Tacla, obrigada pelo incentivo e carinho sincero.

A Eder Zucconi e Almir Cunico,
pelo companheirismo e amizade em um momento
tão importante da minha vida.

A todos os colegas, embriologistas, enfermeiras e funcionários
do grupo Huntington. Obrigada por tudo.

Epígrafe

“Se, encontrando a desgraça e o triunfo,
conseguires tratar da mesma forma a esses dois impostores;
Tu serás um homem, meu filho!”

(Rudyard Kipling)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE GRÁFICOS	x
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Células tronco	18
2.2. Células tronco endometriais	22
2.3. Genes relacionados à atividade das células tronco e endometriose	27
2.4. Células tronco e endometriose	29
3. OBJETIVO	32
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	33
4.1. CASUÍSTICA	33
4.1.1. Pacientes	33
4.1.2. Consentimento	33
4.1.3. Critérios de inclusão	34
4.1.4. Critérios de exclusão	34
4.2. MÉTODOS	34
4.2.1 Obtenção das amostras teciduais	34
4.2.2 Isolamento do RNA	35
4.2.3 Purificação e validação do RNA	36
4.2.4 Análise da expressão gênica pela técnica de transcrição reversa e reação em cadeia de polimerase (RT-PCR)	38

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
6. RESULTADOS	42
7. DISCUSSÃO	50
8. CONCLUSÕES	58
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
10. ANEXOS	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Painel de genes relacionados à atividade das células tronco	40
Tabela 2	Características clínicas das pacientes	44
Tabela 3	Expressão de genes relacionados à atividade das células tronco no peritônio normal, endometriose peritoneal superficial e endometriose peritoneal profunda comparados ao endométrio tópico	45
Tabela 4	Genes subexpressos e superexpressos no peritônio normal [1], endometriose peritoneal superficial [2] e endometriose peritoneal profunda [3] comparados ao endométrio tópico	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Células tronco embrionárias e adultas	21
Figura 2	Exemplo de um eletroesferograma de uma das amostras de RNA avaliadas neste estudo. As pontas agudas e ausência de ombros para o 18S e 28S indicam RNA de alta qualidade	37
Figura 3	Exemplo de uma placa de 96 poços para realização de Reação em Cadeia da Polimerase	39
Figura 4	Número de genes diferencialmente expressos (A); genes superexpressos (B) e genes subexpressos (C) no peritônio normal, endometriose peritoneal superficial e endometriose peritoneal profunda comparados ao endométrio tópico	46
Figura 5	Vias biológicas relacionando o peritônio normal, endometriose peritoneal superficial e endometriose peritoneal profunda ao endométrio tópico	57
Figura 6	Exemplo de curva de amplificação representativa dos ciclos da Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase dos genes	83

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Gráfico demonstrando a normalização dos valores delta Ct	85
------------------	---	-----------

RESUMO

Introdução: As células tronco podem contribuir na patogênese da endometriose. Os objetivos deste estudo foram avaliar e comparar a expressão de genes relacionados à atividade das células tronco no endométrio típico (Et), peritônio normal (PN) e nos implantes de endometriose peritoneal superficial e profunda (EPS/EPP) de mulheres inférteis com endometriose.

Métodos: Vinte e quatro amostras de Et, PN, EPS e EPP foram obtidas durante laparoscopia de seis pacientes. A expressão de 84 genes relacionados à atividade de células tronco foi avaliada pela técnica de transcrição reversa e reação em cadeia de polimerase (RT-PCR).

Resultados: Todos os genes foram expressos no Et, PN, EPS e EPP. Não houve diferença entre o PN, EPS e EPP. Não houve diferença quando as lesões de EPS e EPP foram comparadas entre si. Comparados ao Et, 24, 49 e 45 genes foram diferencialmente expressos no PN, EPS e EPP, respectivamente. Destes genes diferencialmente expressos 23 eram comuns. A análise funcional dos 23 genes evidenciou 5 genes comumente superexpressos (genes reguladores do ciclo celular; comunicação celular e marcador de células embrionárias) e 18 subexpressos (fatores de crescimento; marcadores de células neurais; marcador de auto-renovação; marcador de células embrionárias; divisão celular simétrica e assimétrica; marcadores de células hematopoiéticas; comunicação celular, via de sinalização Notch; via de sinalização Wnt; marcador de células mesenquimais; marcador metabólico e moduladores do cromossomo e da cromatina).

Conclusões: Os genes relacionados à atividade de células tronco estavam expressos no endométrio típico, nas lesões de endometriose peritoneal superficial e

profunda e no peritônio normal. A expressão gênica foi mais semelhante no peritônio normal e nas lesões de endometriose peritoneal superficial e profunda, comparadas ao endométrio tópico. Não se observaram diferenças significantes na expressão gênica entre as lesões de endometriose peritoneal superficial e profunda.

Palavras-chave: células tronco, endométrio, endometriose, expressão gênica.

SUMMARY

Introduction: Stem/progenitor cells may contribute to the pathogenesis of endometriosis. The objective of this study was to identify and compare expression of genes regulating SPCs function in eutopic endometrium (EuE), normal peritoneum (NP) and peritonea superficial and deep infiltrative endometriosis (SE/DIE) of women with pelvic endometriosis.

Methods: Twenty-four biopsies from EuE, NP, SE and DIE were obtained during laparoscopy from 6 patients. The expression of 84 stem cell-related genes was performed using a RT-PCR-based analysis.

Results: All genes analyzed were expressed in the EuE, NP, SE and DIE. No difference was shown between SE, DIE and NP. There was no difference when the SE and DIE were compared to each other. Compared to EuE, 24, 49 and 49 genes were differentially expressed in the NP, SE, and DIE, respectively. Of these differentially expressed genes 23 were the same. Functional analysis demonstrated that 5 genes were commonly overexpressed (cell cycle regulators; cell communication and embryonic cell marker) and 18 underexpressed (growth regulators; neural cell markers; self-renewal marker; embryonic cell marker; symmetric and asymmetric stem cell division; hematopoietic cell markers; cell communication; Wnt pathway; Notch pathway; mesenchymal cell marker; metabolic marker; chromosome and chromatin modulators).

Conclusions: Stem cell related genes were expressed in the human endometrium, peritoneal superficial and deep endometriosis lesions and in the normal peritoneum. There was no difference when superficial and deep endometriosis were compared to each other.

Descriptors: stem cells, endometrium, endometriosis, gene expression.

1. INTRODUÇÃO

A endometriose é definida pela presença e proliferação de tecido endometrial glandular ou estromal fora da cavidade uterina (Vinatier *et al.*, 2001; Clement, 2002; Giudice e Kao, 2004). Sua incidência varia conforme a população estudada, sendo relatada em cerca de 10 a 15% das mulheres em idade reprodutiva (Vinatier *et al.*, 2001) e em até 35 a 50% das mulheres inférteis (Kuohung, 2002). É uma doença heterogênea, responsável por sinais e sintomas significativos e de intensidade variável (Olive e Pritts, 2001). Os implantes endometrióticos podem acometer a superfície do peritônio e dos órgãos pélvicos, denominada de endometriose superficial, sendo histologicamente definida endometriose profunda quando as lesões infiltram os tecidos em mais de 5 mm de profundidade (Nisolle e Donnez, 1997; Giudice e Kao, 2004).

Diversas teorias foram desenvolvidas para explicar a etiologia da endometriose, no entanto, sua patogênese permanece alvo de extensa investigação (Sampson, 1927; Gruenwald, 1942; Benagiano e Brosens, 1991; Vinatier *et al.*, 2001; Clement, 2002; Donnez *et al.*, 2002; Gazvani e Templeton, 2002; D' Hooghe *et al.*, 2003; Giudice e Kao, 2004; Sasson e Taylor, 2008). A teoria dos restos embrionários é considerada a primeira, descrita por Russel em 1899 (Russel, 1899), postula que células embrionárias remanescentes na cavidade peritoneal originariam os focos endométrioticos sobre determinados estímulos (Russel, 1899; Benagiano e Brosens, 1991). Esta hipótese poderia explicar a ocorrência freqüente das lesões de endometriose em locais derivados dos ductos de Muller, como o septo retovaginal, por exemplo. Contudo, esta teoria é incapaz de explicar a distribuição anatômica divergente da doença e a restrição de sua atividade ao período reprodutivo da mulher (Vinatier *et al.*, 2001).

A teoria da metaplasia celômica foi descrita por Meyer em 1919 e publicada em 1924 (Meyer, 1924). Baseia-se na hipótese de que células remanescentes do epitélio

celômico, presentes no tecido peritoneal e ovariano, originariam os focos endometrióticos após transformação metaplásica (Meyer, 1924; Zheng *et al.*, 2005). Uma origem embrionária comum, sob a ação de diferentes estímulos como os hormonais, fatores ambientais, citocinas inflamatórias, resposta imune, entre outros, desencadeariam o processo metaplásico (Gruenwald, 1942; Gardner, 1953). Evidências de implantes ectópicos em sítios distantes da cavidade pélvica como a cavidade torácica (Cassina, 1997), endometriose em homens (Oliker, 1971; Schrodtt, 1980), em mulheres ainda na infância ou pré-púberais (Schiffrin, 1973) e em pacientes com ausência congênita dos ductos de Muller (Olive e Henderson, 1987) fortalecem esta hipótese. No entanto, argumenta-se que, se a metaplasia fosse o evento primário na endometriose sua incidência aumentaria com a idade, fenômeno comum em outras afecções metaplásicas (Vinatier *et al.*, 2001). Enfim, estudos que validem ou excluam esta teoria permanecem hipotéticos (Sasson e Taylor, 2008).

A teoria da menstruação retrógrada é ainda a mais aceita. Fundamenta-se na hipótese de que o desenvolvimento dos focos endometrióticos ocorre devido ao fluxo retrógrado de células endometriais pelas tubas uterinas durante o período menstrual (Sampson, 1927). Entretanto, esta teoria é incapaz de explicar a presença de endometriose em áreas que não apresentam comunicação com a cavidade peritoneal (Vinatier *et al.*, 2001; Sasson e Taylor, 2008). Além disso, células endometriais foram identificadas na cavidade peritoneal de até 90% das mulheres durante o período menstrual (Halme, 1984), sugerindo que o desenvolvimento da doença seja dependente de outros fatores associados ou predisponentes (Vinatier *et al.*, 2001; Sasson e Taylor, 2008). Entre as outras hipóteses destacam-se, a migração linfovascular das células endometrióticas (Halban, 1925), predisposição genética (Simpson *et al.*, 1980), disfunções imunológicas e inflamatórias (Dmowski *et al.*, 2001; Starzinski-Powitz,

2001; D' Hooghe *et al.*, 2003; Pogdaec *et al.*, 2007), estresse oxidativo (Murphy *et al.*, 1998), polimorfismos genéticos (Treolar, 2002; Tempfer *et al.*, 2008; Wieser *et al.*, 2003; D'Amora *et al.*, 2009), resistência à progesterona (Osteen *et al.*, 2005) e recentemente, o envolvimento de células tronco endometriais (Gargett, 2004, 2006, 2007; Schwab e Gargett, 2007) ou provenientes da medula óssea (Taylor, 2004; Du e Taylor, 2007; Mints, 2008; Du e Taylor, 2009).

A maior compreensão da biologia funcional das células tronco trouxe novas perspectivas no conhecimento da patogênese de diversas afeções ginecológicas (Du e Taylor, 2009). A atividade de células da camada basal do endométrio, denominadas células tronco endometriais, foi relacionada à notável capacidade regenerativa e proliferativa deste tecido (Gazvani e Templeton, 2002; D 'Hooghe *et al.*, 2003; Revel, 2009). No entanto, alterações no número, localização e nas vias de sinalização relacionadas a estas células podem contribuir com o desenvolvimento de doenças associadas a uma proliferação endometrial anormal, incluindo endometriose, adenomiose, hiperplasia e ao câncer de endométrio (Gargett, 2007; Revel, 2009). As lesões endometrióticas caracterizam-se por sua complexidade, apresentando alto potencial proliferativo e, por vezes, capacidade infiltrativa (Gargett, 2007). Desta forma, teorias associando a atividade das células tronco endometriais e da medula óssea à patogênese da endometriose foram recentemente propostas (Gargett, 2007; Du e Taylor, 2007, 2009).

Genes reguladores do ciclo celular, remodelamento da cromatina, diferenciação e interação entre as células têm sido implicados na patogênese de diversas doenças e podem ser considerados marcadores da presença de células tronco (Liu *et al.*, 2009). Análises pela técnica de microarranjos de DNA, comparando células endometriais estromais e epiteliais de mulheres com e sem endometriose, demonstraram diferença

significante na expressão de diversos genes e de duas importantes vias de sinalização, RAS/RAF/MAPK e PI3K (Matsuzaki *et al.*, 2005). Sugeriram que alterações nestas vias de sinalização podem contribuir com o crescimento, proliferação, diferenciação, apoptose, adesão e migração celular, relacionados ao início e desenvolvimento dos focos endometrióticos (Matsuzaki *et al.*, 2005). Igualmente, estudo com microarranjo de DNA comparou o endométrio tópico e ectópico de mulheres com endometriose, demonstrando superexpressão de genes que codificam proteínas relacionadas às respostas imune e inflamatória, adesão e remodelamento da matriz extracelular, entre outros, no endométrio ectópico (Eyster *et al.*, 2007). Além disso, evidenciaram a expressão dos genes CDC2, SOX2 e NCAM-1, funcionalmente relacionados à regulação do ciclo celular, auto-renovação e adesão celular, respectivamente (Eyster *et al.*, 2007).

Desta forma, a identificação de genes e de vias de sinalização relacionados à atividade das células tronco poderá colaborar para o melhor conhecimento da patogênese da endometriose e quiçá no desenvolvimento de futuras medidas preventivas e terapêuticas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Células tronco

Células tronco são células indiferenciadas, raramente identificadas em tecidos e órgãos adultos (Laird *et al.*, 2008). Estas células caracterizam-se por suas propriedades funcionais como capacidade de auto-replicação, habilidade de diferenciação, clonogenicidade e elevado potencial proliferativo (Laird *et al.*, 2008; Morrison, 2008). Define-se auto-replicação a capacidade de uma célula gerar uma cópia idêntica a si mesma, preservando desta forma a população de células tronco nos tecidos (Laird *et al.*, 2008). Diferenciação é a habilidade de mudança do fenótipo celular de acordo com as funções a serem exercidas pelas células nos diferentes órgãos e tecidos (Gargett, 2007). Clonogenicidade é uma característica clássica das células tronco, definida como a capacidade de uma única célula formar colônias quando cultivada em baixas densidades *in vitro* (Van Os *et al.*, 2004).

Em geral, as células tronco são classificadas como células tronco embrionárias e adultas. Células tronco embrionárias são células completamente indiferenciadas, presentes exclusivamente nos embriões, podendo ser classificadas como totipotentes ou pluripotentes, de acordo com seu potencial de diferenciação (Morrison, 2008). As células totipotentes são encontradas nos embriões nas primeiras fases de divisão celular e são capazes de diferenciar em todos os tecidos, incluindo a placenta e os anexos embrionários (Morrison, 2008). As células pluripotentes estão presentes nos embriões na fase de blastocisto e são capazes de diferenciação em quase todos os tecidos, exceto a placenta e os anexos embrionários (Morrison, 2008).

A habilidade de diferenciação das células tronco torna-se mais restrita de acordo com a evolução do desenvolvimento embrionário (Gargett, 2007) (Figura 1). As células tronco adultas são descritas como subpopulações celulares raras, relativamente indiferenciadas, com elevada capacidade proliferativa e habilidades de diferenciação e auto-replicação limitadas ao seu sítio de origem (Gargett, 2007; Morrison, 2008; Sasson e Taylor, 2008; Du e Taylor, 2009; Cérvelló *et al.*, 2010). Por um processo conhecido como divisão assimétrica as células tronco adultas originam as células tronco progenitoras, com capacidade de auto-replicação preservada e com habilidade de diferenciação funcionalmente limitada (Gargett, 2007). As células tronco adultas apresentam também divisão simétrica, originando as células tronco progenitoras transitórias, funcionalmente intermediárias entre as células tronco adultas e as células completamente diferenciadas, estas com baixo potencial proliferativo e incapazes de auto-replicação (Gargett, 2007; Morrison, 2008).

As células tronco adultas são reguladas por um microambiente fisiológico denominado nicho (Gargett, 2007; Morrison, 2008). O nicho consiste em um conjunto de células especializadas, responsáveis pela produção e liberação de moléculas que regulam a função, proliferação e diferenciação das células tronco (Gargett, 2007; Morrison, 2008). Os nichos das células tronco variam conforme os diferentes órgãos e tecidos (Gargett, 2007; Morrison, 2008). Comumente, localizam-se na intersecção entre a matriz extracelular e as células diferenciadas (Gargett, 2007). Em humanos os nichos foram melhor caracterizados em tecidos de elevada capacidade proliferativa como o bulbo dos folículos pilosos, criptas intestinais, periosteos e sistema nervoso central (Gargett, 2007). Moléculas de adesão como as caderinas e integrinas foram identificadas como as responsáveis pela interação e integração entre as células tronco, as células do nicho e a matriz extracelular (Gargett, 2007). As células do nicho mantêm

o ciclo celular das células tronco em repouso, fase G0 do ciclo celular, produzindo sinais inibitórios ao crescimento e diferenciação celular, frequentemente envolvendo fator transformador de crescimento β (TGF- β) e proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) (Li e Xie, 2005). Diferentes moléculas sinalizadoras produzidas pelas células do nicho têm sido implicadas na capacidade deste microambiente de controlar o destino das células tronco e a necessidade de renovação e reparação teciduais quando necessárias (Du e Taylor, 2009). Exemplos de moléculas e vias de sinalização provêm de estudos de células germinativas de *Drosophyllas* e aparentemente podem ser extrapoladas para células tronco adultas em humanos (Eckfeldt *et al.*, 2005), destacando-se a via de sinalização Wnt, B-catenina, BMPs (Eckfeldt *et al.*, 2005; Li e Xie, 2005), vias de sinalização Notch e Hedgehog (Gargett, 2007), fator de crescimento derivado de fibroblasto 2 (FGF-2), fator de crescimento derivado da insulina (IGF) e fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF) (Gargett, 2007). Apesar da elevada capacidade regenerativa do endométrio o nicho das células tronco endometriais ainda não foi elucidado (Du e Taylor, 2009).

Estudos *in vivo* de células tronco hematopoiéticas da medula óssea evidenciaram que estas células apresentam capacidade de diferenciação em células nervosas (Mezey, 2000) e hepatócitos (Lagasse, 2000). Ademais, células tronco mesenquimais da medula óssea diferenciaram-se em osteoblastos (Cheng, 1994), cardiomiócitos (Pittenger, 2004), células neuronais (Cho, 2005) e pneumócitos (Rojas, 2005). Conjuntamente, estes dados fortalecem a hipótese de que algumas subpopulações de células tronco adultas apresentam plasticidade, ou seja, não são funcionalmente limitadas a uma linhagem celular ou tecidual específica (Gargett, 2007). Esta plasticidade das células tronco pode estar associada à reparação e regeneração tecidual identificada em diversos processos fisiológicos e patológicos (Gargett, 2007).

Figura 1 - Células tronco embrionárias e adultas

CTE - Células tronco embrionárias

CT- Células tronco

2.2. Células tronco endometriais

O endométrio é um dos tecidos mais dinâmicos do corpo humano, apresentando regeneração e diferenciação celular durante cada ciclo menstrual, no pós-parto, após ressecções cirúrgicas, e em mulheres menopausadas em uso de terapia hormonal (Gargett, 2007). O conceito de que células tronco mesenquimais e epiteliais remanescentes do período embrionário e localizadas na camada basal do endométrio seriam responsáveis por sua intensa atividade regenerativa foi proposto anos atrás (Pranishnikov, 1978; Padykula, 1991). Sob estímulos hormonais as células tronco endometriais migrariam da camada basal do endométrio originando células progenitoras mais diferenciadas e comprometidas com linhagens celulares específicas como células epiteliais, estromais e vasculares (Pranishnikov, 1978; Padykula, 1991).

Subpopulações de células tronco endometriais foram identificadas pela primeira vez no endométrio humano em 2004 (Chan *et al.*, 2004). Chan e colaboradores (2004) demonstraram que tanto as células endometriais epiteliais como as estromais apresentavam clonogenicidade (Chan *et al.*, 2004). Observou-se formação de colônias em 22% das células epiteliais e 1,25% das células estromais em cultura de células obtidas durante histerectomia (Chan *et al.*, 2004). Duas colônias celulares foram identificadas, uma mais rara, com 0,09% de células epiteliais e 0,02% de células estromais, maior densidade, potencial proliferativo e elevada razão núcleo/citoplasma e uma segunda colônia mais freqüente, apresentando menor densidade, razão núcleo/citoplasma reduzido e potencial proliferativo limitado (Chan *et al.*, 2004). Sugeriu-se que a colônia de alta densidade originava-se das células tronco endometrias progenitoras e a de menor densidade das células tronco transitórias (Chan *et al.*, 2004). Ademais, três fatores de crescimento foram identificados e relacionados à

clonogenicidade das células epiteliais e estromais, sendo eles, fator de crescimento derivado das plaquetas-BB (PDGF-BB), fator transformador de crescimento- α (TGF- α) e fator de crescimento da epiderme (EGF) (Chan *et al.*, 2004). As células epiteliais e estromais exibiram maior capacidade clonogênica nas fases proliferativa e secretória do ciclo menstrual, respectivamente, sugerindo a existência de uma regulação hormonal (Chan *et al.*, 2004). Entretanto, outro estudo demonstrou que a clonogenicidade das células tronco endometriais independe da fase do ciclo menstrual e da atividade cíclica do endométrio (Schwab *et al.*, 2005). Estes autores isolaram subpopulações de células do epitélio e do estroma do endométrio de mulheres sem ciclos menstruais, fortalecendo o conceito de que células da camada basal do endométrio permanecem funcionalmente ativas a despeito de estímulo hormonal (Schwab *et al.*, 2005). Posteriormente, outros estudos comprovaram clonogenicidade em cultura de células endometriais humanas (Kato *et al.*, 2007, Dimitrov, 2008, Gargett *et al.*, 2009). Estudos *in vivo* em camundongos foram realizados com o objetivo de identificar os potenciais marcadores destas células bem como de seu nicho celular (Chan e Gargett, 2006; Cervelló *et al.*, 2007; Szotek *et al.*, 2007). Nestes estudos, os núcleos celulares das células uterinas foram marcados através de uma técnica de marcação com corante (Label Retaining Cells - LRC), a qual consiste na aplicação uterina de pulsos de análogo nucleotídeo 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU), substância que se incorpora ao DNA durante a divisão celular, seguida de análise destas células em períodos pré determinados após a aplicação do BrdU (Gargett *et al.*, 2007; Sasson e Taylor, 2008). Durante os ciclos de divisão e proliferação celular o BrdU é progressivamente eliminado do DNA, permanecendo retido nas células de menor atividade. Caracteristicamente, as células tronco precursoras são recrutadas à divisão celular somente em situações de alta atividade proliferativa como dano e reparação tecidual, permanecendo quiescentes em seu sítio de origem

(Gargett, 2007; Gargett *et al.*, 2007; Sasson e Taylor, 2008). Chan e Gargett (2006) demonstraram que 3% das células epiteliais dos camundongos retiveram o BrdU, após 56 dias, e até 6% das células estromais, após um período de 84 dias, evidenciando maior atividade proliferativa do epitélio luminal uterino durante o período puberal e ciclos menstruais dos camundongos (Chan e Gargett, 2006). Outro estudo realizado por Cervelló e colaboradores (2007) demonstrou que 9% de células estromais retiveram o BrdU até 49 dias, com queda para 1,7% após um período de 112 dias, no entanto, neste estudo nenhuma célula epitelial foi identificada, inclusive após breve análise no vigésimo primeiro dia (Cervelló *et al.*, 2007). Estes dois estudos identificaram células estromais marcadas pelo BrdU próximas à junção endométrio-miometrial, compatível com a localização das células da camada basal (Chan e Gargett, 2006; Cervelló *et al.*, 2007). Um terceiro estudo, realizado por Szotec e colaboradores (2007), utilizaram aplicações diárias de BrdU por 7 dias consecutivos, evidenciando que somente as células do estroma e miométrio dos camundongos retiveram o BrdU após 96 dias, estando ausente nas células epiteliais mesmo após o período de 33 dias (Szotec *et al.*, 2007). Apesar de maior facilidade e disponibilidade de realização de estudos experimentais em modelos animais, o endométrio dos camundongos difere fisiologicamente do endométrio humano, portanto, a interpretação dos resultados para humanos deve ser realizada com cautela.

Células tronco da medula óssea foram propostas como fonte alternativa de células tronco endometriais (Taylor, 2004). Diversos estudos demonstraram que células circulantes na corrente sanguínea, provenientes da medula óssea, diferenciaram-se em múltiplos tecidos, incluindo osteoblastos (Cheng, 1994), hepatócitos (Lagasse, 2000), neurônios (Mezey, 2000; Cho, 2005), cardiomiócitos (Pittenger, 2004), pneumócitos (Rojas, 2005), entre outros (Du e Taylor, 2008). Evidências de células endometriais

epiteliais e estromais, derivadas de doadores de medula óssea, foram detectadas por RT-PCR e imunohistoquímica no endométrio de quatro mulheres transplantadas (Taylor, 2004). Este autor sugeriu que células tronco derivadas da medula óssea dos doadores contribuíram para a regeneração do tecido endometrial destas pacientes (Taylor, 2004). Marcadores leucocitários (CD45) foram utilizados para diferenciar os leucócitos derivados do epitélio endometrial dos doadores e receptoras, comprovando que os resultados não tinham relação com invasão leucocitária das células dos doadores. Adicionalmente, fusões entre as células derivadas da medula óssea e as células nativas do endométrio foram excluídas através de um marcador de DNA, o qual não evidenciou excesso de material no núcleo das células das transplantadas (Taylor, 2004). Ademais, a extensão do quimerismo variou de 0,2% a 48% e foi proporcional ao tempo decorrido após transplante e biópsia endometrial (Taylor, 2004). No entanto, a amostra limitada deste estudo não permite determinar o tempo necessário entre o transplante e a repopulação celular uterina.

Em outro estudo, a presença de células provenientes da medula óssea de camundongos machos doadores foi detectada no endométrio de camundongas transplantadas (Du e Taylor, 2007). Apesar de pouco frequentes ($< 0,01\%$), estas células apresentavam capacidade de diferenciação em células epiteliais (Du e Taylor, 2007). Posteriormente, um estudo demonstrou que células endoteliais da medula óssea contribuem para a formação de novos vasos no endométrio (Mints *et al.*, 2008). Neste estudo, biópsias endometriais de uma paciente transplantada de medula óssea foram realizadas durante o parto cesáreo de gestação de 36 semanas, dois anos após o transplante, e um ano após. Estes autores demonstraram que, respectivamente, 14% e 10% das células endoteliais do endométrio obtidos durante o parto cesáreo e em um ano

após o parto, respectivamente, eram provenientes de células do doador (Mints *et al.*, 2008).

Subpopulações de células tronco multipotentes foram identificadas no tecido endometrial (Schwab e Gargett, 2007; Wolff *et al.*, 2007). Durante quatro semanas, culturas de células estromais do endométrio de mulheres em idade reprodutiva foram incubadas com fatores indutores de diferenciação adipogênicos, osteogênicos e miogênicos (Schwab e Gargett, 2007). Resultados evidenciaram que algumas destas células diferenciaram-se em linhagens de células adiposas, ósseas, musculares e cartilaginosas (Schwab e Gargett, 2007). Wolff *et al.* (2007) avaliaram células do endométrio e miométrio uterino, miomas, tubas uterinas e do ligamento uterossacro, obtidas de mulheres em idade reprodutiva, e que foram cultivadas durante 21 dias em meios de diferenciação condrogênicos, dexametasona e fatores de crescimento (Wolff *et al.*, 2007). Análise dos resultados demonstrou que somente as células endometriais apresentavam marcadores de tecido articular cartilaginoso humano, colágeno tipo II e sulfato de glicosaminoglicano, estando ausentes nas demais culturas celulares (Wolff *et al.*, 2007). Desta maneira, sendo o endométrio humano um tecido de fácil acesso e fonte potencial de células pluripotentes, sua aplicabilidade pode se tornar uma importante ferramenta na terapêutica médica.

Recentemente, estudo coordenado por Simón demonstrou que células periféricas (“Side Population Cells”), também denominadas células laterais ou satélites, obtidas do estroma e do epitélio endometrial, apresentavam características genótípicas e funcionais relacionadas à atividade de células tronco somáticas (Cervelló *et al.*, 2010). Capacidade clonogênica e habilidade de diferenciação em linhagens celulares adipogênicas e osteogênicas *in vitro* foram evidenciadas pelas células periféricas (Simón *et al.*, 2010).

O método para identificação das células periféricas fundamenta-se na capacidade destas células de excluir a ligação do corante lipofílico Hoechst 33342 do DNA (Sales-Pardo *et al.*, 2006; Simón *et al.*, 2010). Esse método foi empregado na identificação células tronco somáticas da pele (Larderet *et al.*, 2006), miométrio (Ono *et al.*, 2007) e polpa dental (Iohara *et al.*, 2008). Além disso, foi anteriormente demonstrado, mas não comprovado *in vivo*, no tecido endometrial (Kato *et al.*, 2007).

Enfim, a despeito dos recentes avanços, os métodos disponíveis para caracterização das células tronco adultas são ainda limitados e marcadores celulares específicos das células tronco endometriais ainda não foram identificados (Cervelló e Simón, 2009; Cervelló *et al.*, 2010).

2.3. Genes relacionados à atividade das células tronco e endometriose

Uma cascata de sinais controlados por genes reguladores podem estar relacionados aos processos de reparação e regeneração tecidual e ao desenvolvimento de diversas doenças ginecológicas, incluindo a endometriose. A expressão monoclonal de algumas lesões endometrióticas, a invasão de células E-caderina negativas e N-caderina positivas em algumas lesões de endometriose profunda, bem como evidências sugerindo que algumas lesões de endometriose podem evoluir para carcinomas de células claras do ovário e endometrióide reforçou a hipótese de que esta doença teria relação com a atividade de células tronco (Jimbo *et al.*, 1997; Van Gorp *et al.*, 2004; Gargett, 2007; Gargett *et al.*, 2007). Além dessas observações, a presença de clonogenicidade em cultura de células provenientes de tecido endometriótico foram relatados (Tanaka *et al.*, 2003; Chan e Gargett, 2004).

A expressão gênica das lesões endométrioticas em relação ao endométrio tópico foi avaliada com o objetivo de identificar genes ou mecanismos moleculares potencialmente relacionados à patogênese dessa afecção (Arimoto *et al.*, 2003; Kao *et al.*, 2003; Matsuzaki *et al.*, 2004; Eyster *et al.*, 2007; Kao *et al.*, 2008; Forte *et al.*, 2009; Ohlsson *et al.*, 2009). Nesse aspecto, o endométrio tópico de mulheres com endometriose difere do endométrio de mulheres não acometidas pela doença (Du e Taylor, 2007). Análises pela técnica de microarranjos de DNA demonstraram diferenças significantes na expressão gênica entre o endométrio tópico e ectópico de mulheres com endometriose (Wu *et al.*, 2006). Estudo realizado por Matsuzaki e colaboradores (2005), comparou a expressão gênica de células endometriais epiteliais e estromais obtidas por microdissecção a laser de mulheres com e sem endometriose. Identificaram, pela técnica de microarranjo de DNA, superexpressão de diversos genes relacionados a duas importantes vias de sinalização, ou seja, RAS/RAF/MAPK e PI3K, nas pacientes com endometriose em relação ao grupo controle (Matsuzaki *et al.*, 2005). A superexpressão de 6 genes (RON, SOS, proteína ETA 14-3-3, uPAR, KSR e PI3K p85) foi validada, posteriormente, por RT-PCR. Os autores sugeriram que alterações nestas vias de sinalização, poderiam contribuir com o crescimento, proliferação, diferenciação, apoptose, adesão e migração celular, que se relacionam com o início e o desenvolvimento dos focos endometrióticos (Matsuzaki *et al.*, 2005). Além disso, genes reguladores do ciclo celular, incluindo CCNA2, CCNE1 e CCNE2, mostraram-se superexpressos no endométrio e mulheres com endometriose (Matsuzaki *et al.*, 2005).

Estudo com microarranjo de DNA avaliou 53.000 genes comparando o endométrio tópico e o ectópico de pacientes com endometriose (Eyster *et al.*, 2007). Demonstrou-se que genes que codificam proteínas relacionadas à resposta imune e inflamatória, adesão e remodelamento da matriz extracelular, entre outros, estavam

superexpressos no endométrio ectópico (Eyster *et al.*, 2007). Neste estudo verificou-se também a expressão dos genes CDC2, SOX2 e NCAM-1, funcionalmente relacionados à regulação do ciclo celular, auto-renovação e adesão celular, respectivamente (Eyster *et al.*, 2007). Estes autores sugeriram que alterações imunológicas no meio peritoneal poderiam favorecer a sobrevivência das células endometrióticas na cavidade abdominal (Eyster *et al.*, 2007). Além disso, evidenciaram a expressão dos genes CDC2, SOX2 e NCAM-1, funcionalmente relacionados à regulação do ciclo celular, auto-renovação e adesão celular, respectivamente (Eyster *et al.*, 2007). Além da expressão de diversos genes relacionados à vias de sinalização que poderiam estar associadas à adesão e invasão dos focos endometrióticos (Eyster *et al.*, 2007).

2.4. Células tronco e endometriose

As propriedades funcionais das células tronco podem contribuir com as principais teorias que procuram explicar a patogênese da endometriose (Sasson e Taylor, 2009).

Osuga e colaboradores (2000) compararam a concentração do fator de célula tronco no fluido peritoneal de mulheres com e sem endometriose (Osuga *et al.*, 2000). O fator de células tronco é um ligante da proteína de superfície celular c-kit, expresso durante a embriogênese, agindo como um fator de crescimento em várias linhagens celulares, incluindo as células hematopoiéticas (Osuga *et al.*, 2000). Evidenciaram que o fluido peritoneal das mulheres com endometriose apresentava maior concentração do fator de células tronco, comparativamente aos controles. Essas concentrações achavam-se mais elevadas nas mulheres com doença inicial em relação àquelas com endometriose avançada (Osuga *et al.*, 2000). Assim, devido às propriedades pleiotrópicas do fator de

células tronco sugeriram que o aumento desta citocina poderia ter papel relevante na patogênese da afecção.

Outros autores avaliaram a expressão dos receptores de estrogênio, das duas isoformas do receptor de progesterona e da aromatase P450 no endométrio e em amostras de endométrio ectópico. Demonstram ser o padrão de expressão destes receptores na endometriose semelhante à expressão cíclica da camada basal do endométrio, porém diferente da camada funcional. Adicionalmente, o fluxo menstrual das mulheres com endometriose tinha maior concentração de células da camada basal, em comparação ao de mulheres sem doença (Layendecker *et al.*, 2002). Embasado nas evidências de que as células tronco residem na camada basal do endométrio e que mulheres com endometriose apresentam maior fluxo menstrual retrógrado (Halme, 1984), aventou-se que os implantes endometrióticos poderiam resultar do refluxo de células tronco da camada basal (Layendecker *et al.*, 2002; Sasson e Taylor, 2008).

Hipótese alternativa sugere que células tronco extra-uterinas estariam relacionadas ao desenvolvimento de endometriose (Du e Taylor, 2007). Estudo experimental foi realizado em modelo de camundongo com o objetivo de avaliar se células tronco da medula óssea poderiam migrar e se alojar nas lesões de endometriose (Du e Taylor, 2007). Transplante de medula óssea de camundongos foi realizado após o desenvolvimento de endometriose experimental na cavidade peritoneal de camundongas histerectomizadas, evidenciando que células tronco da medula óssea dos camundongos incorporaram-se ao endométrio ectópico, além de apresentarem diferenciação em células epiteliais e estromais em uma frequência de 0,04% e 0,1%, respectivamente (Du e Taylor, 2007).

Portanto, evidências sugerem que a atividade de células tronco endometriais pode estar relacionada à patogênese da endometriose. Além disso, células tronco extra-

uterinas poderiam dirigir-se ao endométrio tópico ou à cavidade peritoneal e também a outros tecidos, proliferando e diferenciando-se em células endometriais funcionais. Células tronco da membrana basal do endométrio podem refluir pelas tubas uterinas e estabelecer os implantes ectópicos, corroborando com a teoria da menstruação retrógrada. Igualmente, células tronco da medula óssea, endometriais ou de outras fontes, poderiam ser relacionadas ao desenvolvimento de metaplasia. Além disso, aquelas originadas dos remanescentes dos ductos de Muller podem proliferar e dar origem aos focos endometrióticos. Por fim, as células tronco podem migrar pela circulação sanguínea e linfática e gerar focos ectópicos distantes.

Enfim, a participação dessas células na gênese da endometriose representa ainda grande desafio e motivo de polêmica. A identificação do nicho e de vias de sinalização das células tronco endometriais, bem como de genes e vias biológicas relacionados à sua função, poderão contribuir para a melhor compreensão do papel dessas células na fisiologia e no desenvolvimento de doenças do trato reprodutivo. Assim, propusemos a realização deste estudo com o objetivo de avaliar e comparar o padrão de expressão de genes relacionados à atividade de células tronco em lesões de endometriose peritoneal profunda e superficial, no peritônio normal adjacente e no endométrio tópico em pacientes inférteis com endometriose pélvica.

3. OBJETIVO

Avaliar e comparar a expressão de genes relacionados à atividade de células tronco no endométrio tóxico, no peritônio normal e em lesões de endometriose peritoneal superficial e profunda de pacientes inférteis com endometriose pélvica.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. CASUÍSTICA

4.1.1 Pacientes

Neste estudo prospectivo, avaliaram-se quatro amostras obtidas por biópsias do endométrio tópico, de lesões de endometriose peritoneal superficial e profunda e do peritônio normal, perfazendo o total de vinte e quatro amostras, de uma coorte de seis pacientes após realização do cálculo amostral considerando intervalo de confiança de 95% e poder da amostra de 0,8.

As pacientes estavam incluídas no Programa de Reprodução Assistida do Centro de Reprodução Humana (CRH) Governador Mário Covas da Divisão de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) ou da Clínica Huntington Medicina Reprodutiva.

4.1.2 Consentimento

Todas as pacientes receberam informação pormenorizada sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido pós-informado (Anexo 1).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica (CAPPesq) do HC-FMUSP (Anexo 2).

4.1.3 Critérios de inclusão

Foram incluídas no estudo mulheres inférteis, com idade entre 21 e 39 anos. Apresentavam ciclos menstruais regulares com duração de 23 a 35 dias; índice de massa corpórea (IMC: kg/m^2) entre 18 e 28 e não tinham antecedentes de cirurgia prévia para endometriose ou uso de hormônios nos três meses que antecederam a cirurgia. Todas tinham suspeita clínica, bem como ultrassom transvaginal com preparo intestinal ou ressonância magnética de pelve, sugestivos de endometriose peritoneal profunda (Abrão *et al.*, 2007; Chamie *et al.*, 2009).

4.1.4 Critérios de exclusão

Foram excluídas as pacientes com contra-indicação para gravidez ou cirurgia.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção das amostras teciduais

Laparoscopia e histeroscopia diagnósticas foram realizadas no mesmo ato operatório. As biópsias endometriais foram feitas com o cateter de Pipelle logo após a histeroscopia. Parte do tecido endometrial foi enviada para confirmação histológica e outra foi imediatamente conservada em solução preservadora de RNA (RNAlater®, RNA Stabilization Reagent, Qiagen). A laparoscopia foi realizada com uma câmera de 0° pela técnica aberta para a passagem de um trocater de 10 mm na cicatriz umbilical. A seguir, três trocateres acessórios foram posicionados.

Durante a cirurgia, amostras de lesões suspeitas de endometriose peritoneal superficial e profunda e de peritônio normal de sítios distantes dos focos endometrióticos foram removidas. As biópsias de endometriose peritoneal profunda foram realizadas no ligamento útero-sacro de quatro pacientes e na região retro-vaginal de outras duas. As biópsias de endometriose superficial foram feitas na região retrovaginal nas seis pacientes. As de peritônio normal, que constituíram o grupo controle, foram removidas a uma distância de pelo menos 5 cm da borda externa das lesões de endometriose, sob visualização endoscópica direta, características de tecido peritoneal normal. Todas as biópsias foram efetuadas com tesoura laparoscópica e sem utilização de eletrocautério.

Os fragmentos das amostras foram, em parte, conservados em solução preservadora de RNA, (RNAlater®, Stabilization Reagent, Qiagen); outra parte foi usada para confirmação histológica. Todas as amostras foram estocadas a -80 C°.

4.2.2 Isolamento do RNA

O RNA foi isolado usando o reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA). As amostras de tecidos foram descongeladas e homogeneizadas utilizando homogeneizador (Tissumizer, Tekmar, USA), seguido por centrifugação e lise das células (50-100 mg por 1ml de reagente Trizol®). As amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 minutos a 15-30°C, e em seguida adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio por 1ml de Trizol®. As amostras foram incubadas a 15-30°C por 3 minutos e centrifugadas por 15 minutos a 2-8°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e precipitada pela mistura de álcool isopropílico (0,5 ml de álcool isopropílico por 1 ml de Trizol®). As amostras foram incubadas a 15-30°C por 10 minutos e centrifugadas a 2-8°C. Os pellets

de RNA foram lavados com 75% de etanol (1 ml por 1ml de Trizol®), misturados e centrifugados por 5 minutos a 2-8°C. Os pellets de RNA foram secos, dissolvidos em água livre de RNase e armazenados a -80°C até utilização posterior.

4.2.3 Purificação e validação do RNA

A purificação do RNA foi realizada através do RNeasy® Mini Kit (RNeasy® Mini Manual, Qiagen). As amostras foram ajustadas para um volume de 100 µl em água livre de RNase, adicionando 350 µl de solução tampão RLT (fornecido pelo fabricante). As amostras de RNA foram diluídas com 250 µl de etanol (96-100%), transferidas para o dispositivo da coluna RNeasy® mini kit em tubos de 2 ml e centrifugadas por 15 segundos ($\geq 10,000$ rpm). A fase líquida foi descartada e a coluna foi tratada com DNase. A seguir, as colunas foram lavadas com 500 µl de solução tampão RPE (fornecido pelo fabricante) e centrifugadas por 15 segundos adicionais ($\geq 10,000$ rpm). Os sobrenadantes foram descartados e as colunas centrifugadas por 2 minutos ($\geq 10,000$ rpm). As colunas foram recolocadas em tubos novos de 1,5 ml, adicionando-se 50 µl de água livre de RNase e as amostras homogeneizadas e centrifugadas por 1 minuto ($\geq 10,000$ rpm).

A quantidade e a qualidade do RNA resultando foram analisadas por espectrofotometria e eletroforese em gel utilizando um RNA 6000 Nano LabChip® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). A qualidade das amostras de RNA a serem analisadas por PCR foi definida pelos critérios descritos no protocolo do fabricante, RT² ProfilerTM PCR Arrays System Versão 3.3 (SABiosciences, Frederick, MD). Todas as amostras apresentaram razão de absorbância de 260 nm/280 nm, com variação entre 1,8 e 2,1 e exibiram bandas 18S e 28S proeminentes (Figura 2).

Figura 2. Exemplo de um eletroesferograma de uma das amostras de RNA avaliadas neste estudo. As pontas agudas e ausência de ombros para o 18S e 28S indicam RNA de alta qualidade

4.2.4 Análise da expressão gênica pela técnica de transcrição reversa e reação em cadeia de polimerase (RT-PCR)

O kit contido na plataforma gênica de células tronco, The Human Stem Cell RT² Profiler™ PCR Array/RT2 First Strand Kit (SABiosciences), foi utilizado para a preparação do cDNA de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Em suma, a transcrição reversa foi realizada por meio da reação em cadeia utilizando o RNA total como padrão para a síntese do cDNA. A seguir, os produtos resultantes foram diluídos e adicionados à mistura contendo o corante fluorescente SYBR verde. As alíquotas foram distribuídas em uma placa de 96 poços, com cada poço contendo os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para cada gene (Figura 3).

A RT-PCR foi então executada usando uma máquina ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). As condições de ciclagem de RT-PCR foram as seguintes: 40 ciclos de desnaturação a 95 ° C por 15 segundos e extensão do primer a 60°C por 1 minuto. As placas matriz de PCR, contendo um painel de genes preestabelecido, foram empregadas para a normalização dos dados e estimativa do intervalo linear dinâmico do ensaio. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes. A expressão gênica foi calculada usando o método $\Delta\Delta C_t$ comparando a expressão do RNA mensageiro entre amostras indiferenciadas e diferenciadas (Anexo 3).

A ontologia de cada gene foi classificada com base em famílias funcionais e funções biológicas descritas na literatura. Os genes foram classificados como pertencentes aos seguintes grupos: reguladores do ciclo celular, moduladores do cromossomo e da cromatina, reguladores da divisão celular simétrica e assimétrica, marcadores de auto-renovação, citocinas e fatores de crescimento, reguladores da comunicação célula-célula, moléculas de adesão celular, marcadores metabólicos,

marcadores de células embrionárias, marcadores de células hematopoiéticas, marcadores de células mesenquimais, marcadores de células neurais, vias de sinalização Notch e Wnt (Tabela 1).

A análise da expressão gênica foi realizada em colaboração com o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Urologia e Fisiologia da Universidade de Michigan, USA.

Figura 3 – Exemplo de uma placa de 96 poços para realização de Reação em Cadeia da Polimerase

C DNA G - Controle de DNA Genômico

Controle RT- Controle de Transcrição Reversa

Controle PCR- Controle Positivo de Reação em Cadeia da Polimerasa

Tabela 1 - Pannel de genes relacionados à atividade das células tronco**Marcadores Específicos de Células Tronco**

Reguladores de ciclo celular: APC, AXIN1, CCNA2, CCND1, CCND2, CCNE1, CDC2, CDC42, EP300, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, MYC, NOTCH2, PARD6A, RB1

Moduladores do cromossomo e da cromatina: GCN5L2, HDAC2, MYST1, MYST2, RB1, TERT

Reguladores de divisão celular simétrica e assimétrica: DHH, NOTCH1, NOTCH2, NUMB, PARD6A

Marcadores de auto-renovação: HSPA9, MYST1, MYST2, NEUROG2, SOX1, SOX2

Citocinas e fatores de crescimento: BMP1, BMP2, BMP3, CXCL12, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, GDF2, GDF3, IGF1, JAG1

Reguladores da comunicação célula-célula: DHH, DLL1, GJA1, GJB1, GJB2, JAG1

Moléculas de adesão celular: APC, BGLAP, CD4, CD44, CDH1, CDH2, COL9A1, CTNNA1, CXCL12, NCAM1

Marcadores metabólicos: ABCG2, ALDH1A1, ALDH2, FGFR1

Marcadores de Diferenciação de Células Tronco

Marcadores de células embrionárias: ACTC1, ASCL2, FOXA2, PDX1 (IPF1), ISL1, KRT15, MSX1, MYOD1, T

Marcadores de células hematopoiéticas: CD3D, CD4, CD8A, CD8B, MME

Marcadores de células mesenquimais: ACAN (AGC1), ALPI, BGLAP, COL1A1, COL2A1, COL9A1, PPARG

Marcadores de células neurais: CD44, NCAM1, OPRS1, S100B, TUBB3

Vias de Sinalização Importantes para a Manutenção de Células Tronco

Via de Sinalização Notch: DLL1, DLL3, DTX1, DTX2, DVL1, EP300, GCN5L2, HDAC2, JAG1, NOTCH1, NOTCH2, NUMB

Via de Sinalização Wnt: ADAR, APC, AXIN1, BTRC, CCND1, FRAT1, FZD1, MYC, PPARG, WNT1

Fonte: SABiosciences

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do software Limma (Linear Models for Microarray Data), versão 2.7.0. As diferenças de expressão gênica foram avaliadas pelo teste estatístico t de Student, valores de p e valores de p-ajustado. As razões de expressão foram calculadas para normalizar os valores de limiares de ciclo (ΔCt) (Anexo 3). Valores de p-ajustado menores que 0,05 foram considerados significantes (Tan e Yan, 2006). Posteriormente, o programa Ingenuity Systems Analysis versão 7.0 foi utilizado para a avaliação das vias biológicas.

A análise estatística foi realizada em colaboração com o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Urologia e Fisiologia da Universidade de Michigan, USA.

6. RESULTADOS

A confirmação diagnóstica das lesões suspeitas de endometriose foi baseada em achados histológicos consistentes. De acordo com os critérios clássicos de Noyes (Noyes *et al.*, 1950), a datação das biópsias de endométrio demonstraram 5 pacientes na fase proliferativa e 1 paciente na fase secretória inicial do ciclo menstrual. As pacientes foram classificadas como estágios III e IV de endometriose pelos critérios da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM). Nenhuma delas apresentava endometrioma ovariano (Tabela 2).

Todos os genes avaliados foram expressos nas amostras teciduais de Et, PN, EPS e EPP.

Quando as lesões de EPS e EPP foram comparadas ao PN não se observaram diferenças significantes. Da mesma forma, não houve diferenças quando as lesões de endometriose superficial e profunda (EPS/EPP) foram comparadas entre si. Ao contrário, verificou-se que 24, 49 e 45 genes foram diferencialmente expressos quando compararam-se as amostras de PN e as lesões de endometriose superficial (EPS) e profunda (EPP) ao Et, respectivamente (Tabela 3).

Em relação às amostras de Et, número significativamente menor de genes mostraram-se superexpressos (baseado na razão de expressão) no PN e nas lesões de endometriose superficial e profunda (EPS/EPP) em comparação ao número de genes subexpressos (Figura 4A).

Dos genes superexpressos, 5 deles manifestaram-se em todas as amostras (PN, EPS e EPP), comparativamente ao Et; 1 gene mostrava-se superexpresso nas amostras de PN e EPP e, 3 outros estavam superexpressos exclusivamente nas lesões de EPP (Figura 4B).

Quanto aos genes subexpressos, 18 estavam subexpressos em todas as amostras (PN, EPS e EPP) em relação ao Et; 16 exclusivamente nas lesões endometrióticas (EPS/EPP); 10 somente nas lesões de EPS e 2 genes exclusivamente subexpressos nas lesões de EPP (Figura 4C).

Nenhum gene apresentou-se super ou subexpresso exclusivamente no PN quando comparado ao endométrio tópico (Figura 4).

A análise funcional dos 23 genes diferencialmente expressos em todas as amostras (PN, EPS e EPP), em comparação ao Et, evidenciou 5 genes superexpressos: reguladores do ciclo celular - CDC2, CCNA2, CCNE1; comunicação célula-célula - CJB1; marcador de células embrionárias - FOXA2, enquanto 18 genes achavam-se subexpressos: fatores de crescimento - BMP3, CXL12, FGFR1; marcadores de células neurais - S100B, NCAM1; marcador de auto-renovação - SOX2; marcador de células embrionárias - ISL1; divisão celular simétrica e assimétrica - DHH, NOTCH2; marcadores de células hematopoiéticas - CD8A, CD3D; comunicação célula-célula - JAG1; Via Wnt - PPARG; Via Notch - NOTCH2, DTX2; marcador de células mesenquimais - ACAN; marcador metabólico - ALDH2; moduladores cromossômico e cromatina - MYST1, GCN5L2 (Tabela 4).

Tabela 2- Características clínicas das pacientes

Paciente (n°)	Idade (anos)	Fase do Ciclo Menstrual	Grau de Endometriose (ASRM)	Endometrioma
1	28	FP	III	Não
2	34	FP	III	Não
3	39	FSI	IV	Não
4	39	FP	III	Não
5	38	FP	IV	Não
6	37	FP	III	Não

FP: fase proliferativa

ESP: fase secretória inicial

ASRM: Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva

Tabela 3- Expressão de genes relacionados à atividade das células tronco no peritônio normal, endometriose peritoneal superficial e endometriose peritoneal profunda comparada à do endométrio tópico

	Total de genes p ajustado <0,05
Peritônio normal vs. Endométrio tópico	24
Endometriose peritoneal superficial vs. Endométrio tópico	49
Endometriose peritoneal profunda vs. Endométrio tópico	45

Figura 4 - Número de genes diferencialmente expressos (A); genes superexpressos (B) e genes subexpressos (C) no peritônio normal, endometriose peritoneal superficial e endometriose peritoneal profunda comparados ao endométrio tópico

PN: peritônio normal

EPS: endometriose peritoneal superficial

EPP: endometriose peritoneal profunda

Tabela 4 - Genes subexpressos e superexpressos no peritônio normal [1], endometriose peritoneal superficial [2] e endometriose peritoneal profunda [3] comparados ao endométrio tópico

Grupo Funcional	Gene	Descrição	Razão de Expressão
Citocinas e fatores de crescimento	BMP3	Proteína morfogenética óssea 3	- 120.5(1) - 27.7 (2) - 48.2 (3)
	CXCL12	Fator derivado do estroma 1	- 7.0 (1) - 7.9 (2) - 5.2 (3)
	FGFR1	Receptor do fator de crescimento de fibroblasto 1	- 3.2 (1) - 3.7 (2) - 3.3 (3)
	JAG1	Jagged 1	- 2.5 (1) - 5.7 (2) - 3.7 (3)
Marcadores de células neuronais	S100B	Proteína ligadora de cálcio S100B	- 51.7 (1) - 36.6 (2) - 31.3 (3)
	NCAM1	Molécula de adesão neural 1	- 5.7 (1) - 9.9 (2) - 8.3 (3)
Regulação da comunicação célula-célula	DHH	Homólogo desert hedgehog	- 5.0 (1) - 7.0 (2) - 6.9 (3)
	JAG1	Jagged 1	- 2.5 (1) - 5.7 (2) - 3.7 (3)
	GJB1	Proteína tipo junção Gap, beta 1, 32kDa	8.2 (1) 3.9 (2) 8.5 (3)

Marcadores de células hematopoiéticas	CD8A	Molécula CD8a	- 4.0 (1) - 6.4 (2) - 3.3 (3)
	CD3D	Molécula CD3d, delta (Complexo CD3-TCR)	- 2.9 (1) - 3.9 (2) - 2.0 (3)
Moduladores do cromossomo e da cromatina	GCN5L2	Controle da síntese de aminoácidos GCN5 tipo 2	- 2.5 (1) - 3.5 (2) - 3.3 (3)
	MYST1	Histona acetil transferase MYST 1	- 1.9 (1) - 2.4 (2) - 2.2 (3)
Via de sinalização Notch	NOTCH2	Homólogo 2 Notch	- 1.8 (1) - 2.3 (2) - 2.0 (3)
	DTX2	Homólogo 2 Deltex	- 2.0 (1) - 3.7 (2) - 2.7 (3)
Marcador de auto-renovação	SOX2	Região sexual determinante Y	- 14.4 (1) - 15.0 (2) - 15.6 (3)
Marcadores de células embrionárias	ISL1	Proteína Isl-1 do realçador do gene ISL1	- 15.7 (1) - 14.2 (2) - 14.7 (3)
	FOXA2	Proteína forkhead Box A2	5.2 (1) 16.6 (2) 17.5 (3)
Via de sinalização Wnt	PPARG	Receptor gama ativador de proliferação de peroxisomo	- 6.9 (1) - 5.5 (2) - 4.8 (3)
Marcadores de células mesenquimais	ACAN	Aggrecan	- 3.3 (1) - 4.8 (2) - 5.5 (3)

Marcadores metabólicos	ALDH2	Família aldeído desidrogenase 2	- 2.7 (1) - 5.0 (2) - 4.3 (3)
Divisão celular simétrica e assimétrica	NOTCH2	Homólogo 2 Notch	- 1.8 (1) - 2.3 (2) - 2.0 (3)
Reguladores do ciclo celular	CDC2	Divisão do ciclo celular, G1 para S e G2 para M	3.9 (1) 8.3 (2) 7.7 (3)
	CCNA2	Ciclina A2	2.8 (1) 4.3(2) 4.7(3)
	CCNE1	Ciclina E1	3.0 (1) 3.3 (2) 2.4 (3)

7. DISCUSSÃO

Nosso estudo mostrou que os genes relacionados à atividade das células tronco estão expressos no endométrio humano, nas lesões de endometriose peritoneal superficial e profunda, bem como no peritônio normal. Como a endometriose é uma doença de expressão heterogênea, na dependência de sua localização e extensão (Nisolle e Donnez, 1997; Clement, 2002), incluímos pacientes com doença extensa, uma vez que estas teriam maior probabilidade de apresentar as diferentes manifestações das lesões endometrióticas, favorecendo a interpretação da expressão gênica nos diversos sítios anatômicos de um mesmo indivíduo. Nenhuma paciente incluída havia sido submetida a procedimentos cirúrgicos prévios, o que favorece a interpretação da expressão gênica sem a interferência de elementos celulares relacionados ao processo de cicatrização. Além disso, uma vez que a patogênese dos endometriomas ovarianos permanece controversa, sendo considerada uma doença distinta da endometriose peritoneal por alguns autores (Nisolle e Donnez, 1997), pacientes com endometrioma foram excluídas.

As lesões de endometriose apresentam constituição histológica complexa, caracterizada por células endometriais epiteliais e estromais, intensa fibrose, elementos vasculares e células imunológicas (Nisolle e Donnez, 1997; Vinatier *et al.*, 2001; Clement, 2002; Giudice e Kao, 2004; Eyster *et al.*, 2007). De acordo com a teoria de que todos estes elementos celulares, em conjunto, participam na patogênese da endometriose, optamos por não dissecar as várias células que constituem a lesão endometriótica e sim realizar a análise tecidual. Desta forma, as expressões gênicas demonstradas nas amostras de endométrio tópico, peritônio normal e das lesões de endometriose superficial e profunda representariam a contribuição destas diversas linhagens celulares. Estatisticamente, ao compararmos os resultados das expressões dos

genes relacionados à atividade das células tronco nas diferentes lesões de uma mesma paciente, minimizaríamos a contribuição de cada elemento celular. Além disso, a realização de análise qualitativa da expressão gênica, em detrimento de análise quantitativa, reduziria ainda mais a possível contribuição isolada dos elementos celulares nas lesões endometrióticas.

Os dados obtidos demonstraram haver maior expressão de genes e vias de sinalização relacionados à atividade de células tronco nas lesões endometrióticas e no endométrio típico em relação à expressão no peritônio normal, sendo que a razão de superexpressão foi mais significativa nas amostras de endométrio normal. Entre os genes e vias de sinalização expressos, destacam-se os relacionados à atividade de auto-renovação, proliferação, adesão e comunicação celular, além de citocinas e fatores de crescimento relacionados à resposta inflamatória. Esses achados são condizentes com a rápida proliferação e regeneração tecidual inerente tanto às lesões endometrióticas quanto ao endométrio típico. Igualmente, estudos anteriores demonstraram clonogenicidade em cultura de células provenientes de lesões endometrióticas (Tanaka *et al.*, 2003; Chan e Gargett, 2004) e do endométrio típico (Chan e Gargett, 2004). Além disso, células tronco epiteliais e mesenquimais já foram isoladas no endométrio humano (Chan e Gargett, 2004; Revel, 2009).

A Tabela 4 desvela os genes que se mostraram super e subexpressos, com as respectivas razões de expressão, nas amostras de peritônio normal e de endometriose peritoneal superficial e profunda em relação ao endométrio. Quando comparamos com o endométrio típico, observamos que 24, 49 e 45 genes estavam diferencialmente expressos no peritônio normal e na endometriose superficial e profunda, respectivamente. Destes genes, 23 eram comuns.

A citocina e fator de crescimento *BMP3* apresentou maior razão de

superexpressão no endométrio tópico do que no PN, EPS e EPP. As *BMPs*, isto é, proteínas ósseas morfogenéticas, constituem uma família de proteínas reguladoras da formação óssea e cartilaginosa *in vivo* (Alper, 1994). Possuem capacidade de acelerar ou iniciar o processo de reparação tecidual, além de estimularem a neoformação óssea quando implantadas em sítios extra ósseos (Alper, 1994). Demonstrou-se que membros da família das *BMPs* foram encontrados no nicho de células tronco adultas, produzindo sinalização inibidora para o crescimento e diferenciação celular (Li e Xie, 2005; Gargett, 2007). Interações complexas entre as vias *Notch*, *Wnt*, *BMPs* e outras vias biológicas, são fundamentais no processo de embriogênese, proliferação e regeneração tecidual (Zamurovic *et al.*, 2004). Outrossim, dois genes reguladores do ciclo celular, *CCNA2* e *CCNE1*, funcionalmente relacionados ao atraso, parada e início do ciclo de diversas linhagens celulares (Matsuzaki *et al.*, 2005), estavam superexpressos no PN, EPS e EPP em relação ao Et. Importante função do nicho é a manutenção das células tronco adultas em estado de quiescência (Li e Xie, 2005). Avaliados em conjunto, estes dados sugerem que os genes *BMP3*, *CCNA2* e *CCNE1* poderiam exercer funções específicas como proliferação, regeneração e reparação, entre outras, no nicho das células tronco localizados no endométrio tópico e ectópico.

Os genes *NCAM-1* e *SOX2* estavam subexpressos nas lesões endometrióticas e no peritônio normal quando comparados ao endométrio tópico. Nesse particular, diferença semelhante na expressão destes genes já havia sido descrita por Eyster e colaboradores (2007) no endométrio tópico e ectópico de pacientes com endometriose (Eyster *et al.*, 2007).

Outros genes, *FOXA2*, *CDC2* e *CCNA2* apresentaram também superexpressão ligeiramente superior nas lesões de endometriose em comparação ao PN, sugerindo haver aumento na sua expressão nos tecidos endometrióticos. Entretanto, como não

houve diferença quando as lesões de endometriose superficial e profunda foram comparadas, poderíamos inferir que esses genes não estariam relacionados ao mecanismo de invasão da doença.

Os genes *CDC2* e *CCNA2* estão funcionalmente ligados à regulação do ciclo celular e são responsáveis, respectivamente, pela entrada das células na fase S e pela mitose através da promoção das transições G1/S e G2/M do ciclo celular. A expressão do gene *CDC2* é regulada pelo ciclo celular e acha-se restrita às células com atividade proliferativa (Dalton, 1992). A corroborar com nossos resultados, Eyster e colaboradores (2007) já haviam observado, tanto no endométrio típico como no ectópico de mulheres com endometriose, dados similares (Eyster *et al.*, 2007). Além disso, Matsuzaki e colaboradores (2005), ao compararem a expressão gênica em células endometriais epiteliais e estromais de mulheres com endometriose profunda com a de mulheres sem doença, demonstraram que o gene *CCNA2* estava significativamente superexpresso nas células do estroma das pacientes com endometriose (Matsuzaki *et al.*, 2005).

Embora não tenha sido demonstrada diferença estatística na expressão gênica entre as lesões de endometriose superficial e profunda, os genes *DTX1*, *HPRT1*, e *CDH1* estavam superexpressos somente nas lesões de EPP, quando comparado ao Et (Figura 4C). O gene *DTX1* participa da via *Notch*, via de sinalização importante para a manutenção e homeostase das células tronco (Farnie e Clarke, 2007; Van de Walle *et al.*, 2009). Verificou-se que a via *Notch* é ativada no nicho das células tronco, sendo responsável pela regulação e manutenção da reparação tecidual e pela ativação da proliferação e diferenciação das células-tronco residentes (Gargett, 2007; Gargett *et al.*, 2007). Em nosso estudo, o gene *DTX-1* mostrou-se superexpresso nas lesões de EPP, com razão de expressão relativamente superior à razão observada nas lesões de EPS.

Estudos prévios demonstraram que maior atividade da via *Notch* leva a aumento da expressão do gene *DTX1* e que a via *Notch* está associada com a capacidade de invasão de algumas doenças, como câncer de mama, por exemplo (Farnie e Clarke, 2007). Estas observações sugerem que a ativação da via de sinalização *Notch* pode também estar associada com a invasividade das lesões endometrióticas.

Diferentes funções podem ser relacionadas aos genes superexpressos nas lesões de endometriose, como proliferação, crescimento e formação de células musculares, fibroblastos e leucócitos, elementos frequentemente identificados nos implantes endometrióticos (Clement, 2007). Embora sejam relativamente inespecíficas, essas funções poderiam também ocorrer no nicho das células tronco.

A análise funcional dos 84 genes demonstrou haver oito vias biológicas associadas os 23 genes comuns que se mostraram diferencialmente expressos nas amostras de PN, EPS e EPP em relação ao Et. Entre essas vias, quatro tiveram maior superexpressão: duas relacionadas com a EPS e o Et (ciclo celular, desordens do sistema músculo esquelético e câncer - escore: 50; morfologia celular, desenvolvimento e função do sistema nervoso, proliferação e desenvolvimento celular – escore: 24). Outra relacionada ao PN e ao Et (desenvolvimento celular, desenvolvimento embrionário e doenças genéticas – escore: 42); e uma ligada à EPP e ao Et (ciclo celular, apoptose e desenvolvimento e função do tecido conectivo – escore: 22) (Figura 5).

Devido às características funcionais das células tronco, estas células podem contribuir com as diferentes teorias da endometriose (Du e Taylor, 2009). De acordo com observações de que mulheres com endometriose apresentam mais refluxo menstrual quando comparadas com mulheres sem endometriose (Halme, 1984), da existência de células tronco na camada basal do endométrio (Leyendecker *et al.*, 2002) e que o defeito primário na endometriose pode se originar no endométrio tópico

(Dmowski *et al.*, 2001), especula-se que o refluxo de células tronco a partir da camada basal do endométrio seja a origem dos focos endometrióticos (Leyendecker *et al.*, 2002; Starzinski-Powitz *et al.*, 2003). Além disso, como a endometriose é uma doença crônica, é necessário, geralmente, alguns anos para o desenvolvimento dos focos endometrióticos e sua manifestação clínica. Desta forma, a semelhança na expressão entre as lesões endometrióticas e o PN, bem como a significativa superexpressão no endométrio tópico demonstradas neste estudo, podem retratar a maior ou menor atividade celular relacionada às funções exercidas por esses genes no tecido peritoneal normal e endometriótico secundárias ao fluxo menstrual retrógrado.

No entanto, as semelhanças na expressão dos genes relacionados às células tronco entre o PN, EPS e EPP, assim como as diferenças compartilhadas entre estes tecidos quando comparados ao Et, sugerem que, em relação à expressão destes genes, a endometriose seria mais semelhante ao tecido peritoneal normal do que ao endométrio. Essas observações são mais consistentes com as hipóteses da metaplasia celômica e dos restos embrionários e podem sugerir que o peritônio das mulheres com endometriose teria expressão gênica anômala, com superexpressão de genes e vias de sinalização relacionados à ativação de células tronco, predispondo assim ao desenvolvimento dos focos endometrióticos. Adicionalmente, estes achados poderiam decorrer de um ambiente peritoneal comum ou de fatores ativadores semelhantes nesses tecidos.

A caracterização da expressão gênica de amostras de PN obtidas de mulheres livres da doença representaria importante contribuição para a análise e validação dos dados demonstrados neste estudo. Entretanto, todas as biópsias de tecido peritoneal normal avaliadas foram realizadas em sítios seguramente distantes das lesões endometrióticas, com margem de segurança maior que 5 cm, sob visualização endoscópica direta e posterior comprovação histológica. Desta forma, nossos achados

representam o padrão de expressão gênica do tecido peritoneal normal. Contudo, não podemos excluir a possibilidade de que estas observações possam resultar de um ambiente peritoneal comum, de menstruação retrógrada anterior ou de proliferação linfovascular de células tronco provenientes de fontes alternativas.

Enfim, as semelhanças compartilhadas entre o peritônio normal, a endometriose peritoneal superficial e profunda em relação ao endométrio, sugerem que, quanto à expressão dos genes avaliados em nosso estudo, o tecido endometriótico teria comportamento mais semelhante ao do tecido peritoneal do que ao endométrio tópico. Da mesma forma, essas observações sugerem que o peritônio das mulheres com endometriose poderia apresentar expressão gênica anômala, com superexpressão de genes e vias de sinalização relacionados à ativação de células tronco, podendo interagir com outros fatores associados à patogênese dessa afecção.

Figura 5 - Vias biológicas relacionando o peritônio normal, endometriose peritoneal superficial e endometriose peritoneal profunda ao endométrico tópico

PN: peritônio normal

EPS: endometriose peritoneal superficial

EPP: endometriose peritoneal profunda

8. CONCLUSÕES

Nosso estudo permite concluir que, em mulheres inférteis com endometriose peritoneal:

- Os 84 genes relacionados à atividade de células tronco estavam expressos no endométrio tópico, nas lesões de endometriose peritoneal superficial e profunda e no peritônio normal;
- A expressão gênica foi mais semelhante no peritônio normal e nas lesões de endometriose peritoneal superficial e profunda, comparadas ao endométrio tópico;
- Não se observaram diferenças significantes na expressão gênica entre as lesões de endometriose peritoneal superficial e profunda.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrão MS, Goncalves MO, Dias JA Jr, Podgaec S, Chamie LP, Blasbalg R. Comparision between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis. *Hum Reprod* 2007; 22(12): 3092-7.
2. Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci Suppl* 2003; 1:11830-5.
3. Alper J. Boning up: newly isolated proteins heal bad breaks. *Science* 1994; 263 (5145):324-325.
4. Arimoto T, Katagiri T, Oda K, Tsunoda T, Yasugi T, Osuga Y. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis. *Int J Oncol* 2003; 22: 551-60.
5. Benagiano G and Brosens I. *Human Reproduction*, 1991; Vol. 6, (7): 963-968.
6. Bjerknes M, Cheng H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* 1999; 116:208-10.
7. Bulun SE, Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Sebastian S. Estrogen production and metabolism in endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2002; 955: 75-85.
8. Cassina, PC. Catamenial hemoptysis: diagnosis with MRI. *Chest* 1997; 111:1450.
9. Cervelló I, Martinez-Conejero JA, Horcajadas JA, Pellicer A and Simón C. Identification, characterization and co-localization of label retain- ing cell population in mice endometrium with typical undifferentiated markers. *Hum Reprod* 2007; 22: 45-51.
10. Cervelló I, Simón C. Somatic stem cells in the endometrium. *Reprod Sci* 2009; 16(2):200-205.
11. Cervelló I, Gil-Sachis C, Mas A, Delgado-Rosas F, Martínez-Conejero JA, Galán

- FJ, O'Connor JE, Pellicer A, Simón C. Human endometrial side population cell exhibit genotypic, phenotypic and functional features of somatic stem cells. *Plos One* 2010; 5(6): e10964.
12. Chamie LP, Blasbalg R, Goncalves MO, Carvalho FM, Abrao MS, de Oliveira IS. Accuracy of magnetic resonance imaging for diagnosis and preoperative assessment of deeply infiltrating endometriosis. *Int J Gynecol Obstet* 2009; 106(3): 198-201.
 13. Chan RWS, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of Human Endometrial Epithelial and Stromal Cells. *Biology of Reproduction* 2004; (70): 1783-1750.
 14. Chan RW, Gargett CE. Identification of label-retaining cells in mouse endometrium. *Stem Cells* 2006; 24: 1529-1538.
 15. Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 1994; 134: 277-286.
 16. Cho KJ, Trzaska KA, Greco SJ. Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 alpha. *Stem Cells* 2005; 23: 383-391.
 17. Clement PB. Diseases of the Peritoneum. In: Robert J.Kurman, editor. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. Fifth edition ed. Baltimore: R.R. Donnelley and Sons, Willard OH.; 2002. p. 745-71.
 18. Dalton S. Cell cycle regulation of the human cdc2 gene. *EMBO J.* 1992; 11(5): 1797–1804.
 19. D'Amora P, Maciel TT, Tambellini R, Mori MA, Pesquero JB, Sato H, Girao MJBC, Silva IDC, Schor E. Disrupted Cell Cycle Control in Cultured Endometrial Cells from Patients with Endometriosis Harboring the Progesterone Receptor Polymorphism PROGINS. *American Journal of Pathology* 2009; 175: 215-224.

20. D' Hooghe TM, Debrock S, Meuleman C, Hill JA, Mwenda JM. Future directions in endometriosis research. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2003; 30: 221-244.
21. Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod* 2001; 16: 1802-1808.
22. Donnez J, Van Langendonckt A, Casanas-Roux F, Van Gossum JP, Piarard C, Jadoul P, Squifflet J, Smets M. Current thinking on the pathogenesis of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2002; 54: 52-62.
23. Du H and Taylor HS. Contribution of Bone Marrow-Derived Stem Cells to Endometrium and Endometriosis. *Stem Cells* 2007; 25: 2082–2086.
24. Du H and Taylor HS. Stem Cells and Female Reproduction. *Reproductive Sciences* 2009; 16(2): 126-139.
25. Eckfeldt CE, Mendenhall EM and Verfaille CM. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:726-737.
26. Eckfeldt CE, Mendenhall EM, Verfaille CM. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:726-737.
27. Eyster KM, Klinkova O, Kennedy VBS, Hansen KA. Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrial. *Fertil and Steril* 2007; 88(6) 1505-1533.
28. Farnie G, Clarke RB. Mammary stem cells and breast cancer- role of Notch signaling. *Stem Cell Rev* 2007; 3(2): 169-75.
29. Forte A, Schettino MT, Finicelli M, Cipollaro M, Colacurci N, Cobellis L, Galderisi U. Expression pattern of stemness-related genes in human endometrial and endometriotic tissues. *Mol Med* 2009; 15 (11-12): 392-401.
30. Gardner, GH. Endometriosis. *Obstet Gynecol* 1953; 1: 623.

31. Gargett CE. Stem cells in gynaecology. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 2004; 44: 380-386.
32. Gargett CE. Identification and characterization of human endometrial stem/progenitor cells. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 2006; 46: 250-253.
33. Gargett CE. Uterine stem cell: What is the evidence? *Human Reproduction Update* 2007; 13(1):87-101.
34. Gargett CE, Chan RWS, Schwab KE. Endometrial stem cells. *Current Opinion in Obstet and Gynecol* 2007; 19:377-383.
35. Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod* 2009; 80(60): 1136-45.
36. Gazvani R, Templeton A. New considerations for the pathogenesis of endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 76: 117-126.
37. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004; 364, 1789–1799.
38. Grummer R. Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 641-649.
39. Grunenwald, P. Origin of endometriosis from the mesenchyme of the coelomic walls. *Am J. Obstet Gynecol* 1942; 44: 474.
40. Halban J. Hysteroadenosis metastatica. *Zentralb Gynäkol* 1925; 7:387-91.
41. Halme J. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 154.
42. Honda H, Barrueto F, Gogusev J, Im DD, Morin PJ. Serial analysis of gene expression reveals differential expression between endometriosis and normal peritoneum. Possible roles for AXL and SHC1 in the pathogenesis of endometriosis. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2008; 6-59.

43. Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, et al. A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells* 2008; 26(9): 2408–18.
44. Jimbo H, Hitomi Y, Yoshikawa H, Yano T, Momoeda M, Sakamoto A, Tsutsumi O, Taketani Y, Esumi H. Evidence for monoclonal expansion of epithelial cells in ovarian endometrial cysts. *Am J Pathol* 1997; 150:1173 -1178.
45. Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Osteen K. Expression Profiling of Endometrial from Women with Endometriosis Reveals Candidate Genes for Disease-Based Implantation Failure and Infertility. *Endocrinology* 2008; 144(7): 2870-2881.
46. Kato K, Yoshimoto M, Kato K. Characterization of side-population cells in human normal endometrium. *Hum Reprod* 2007; 22: 1214-1223.
47. Kuohung W, 2002. Characteristics of patients with endometriosis in the United States and the United Kingdom. *Fertil Steril* 78:772.
48. Kurita T, Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E. Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/gamma c (null) immunodeficient mice. *Proc Natl Aca Sci USA* 2007; 104:1925-1930.
49. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234.
50. Laird DJ, Von Andrian UH, Wagers AJ. Stem Cell Trafficking in Tissue Development, Growth, and Disease. *Cell* 2008; (132):612-630.
51. Larderet G, Fortunel NO, Vaigot P, Cegalerba M, Malte` re P, et al. Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis. *Stem Cells* 2006; 24(4): 965–74.

52. Leyendecker G. Endometriosis results from the dislocation of basal endometrial. *Hum Reprod* 2002; 17: 2736.
53. Li L and Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21:605-631.
54. Liu L, Ling J, Wei X, Wu L and Xiao Y. Stem Cell Regulatory Gene Expression in Human Adult Dental Pulp and Periodontal Ligament Cells Undergoing Odontogenic/Osteogenic Differentiation. *J. Endod.* 2009; 35(10): 1368-76.
55. Matsuzaki S, Canis M, Vaurs-Barriere C, Pouilly JL, Boespflug-Tanguy O, Penault-Llorca F. DNA microarray analysis of gene expression profiles in deep endometriosis using laser capture microdissection. *Mol Hum Reprod* 2005; 10: 719-28.
56. Meyer R. Zur Frage der heterotopen Epithelwucherung, insbesondere des Peritonealepithels und in die Ovarien. *Virch Arch Path Anat Phys* 1924; 250: 595-610.
57. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290: 1779-1782.
58. Mints M, Jansson M, Sadeghi B, Westgren M, Uzunel M, Hassan M et al. Endometrial endothelial cells are derived from donor stem cells in a bone marrow transplant recipient. *Human Reproduction* 2008; Vol.23, No.1 pp. 139–143.
59. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell* 2008; 132: 598-611.
60. Murphy AA, Santanam N, Parthasarathy S. Endometriosis: a disease of oxidative stress? *Sem Reprod Endocrinol* 1998; 16:263-73.
61. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997, 68 (4): 585-96.

62. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril*. 1950; 1(1): 3-25.
63. Ohlsson Teague EM, et al. MicroRNA-Regulated Pathways Associated with Endometriosis. *Mol Endocrinol* 2009; 23:265-75.
64. Olicker, AJ and Harris, AE. Endometriosis of the bladder in a male patient. *J Urol* 1971; 106:859.
65. Olive DL and Henderson DY. Endometriosis and mullerian anomalies. *Obstet Gynecol* 1987; 69:415.
66. Olive DL, Pritts EA. Treatment of endometriosis. *N Engl J Med* 2001; 345:266-275.
- 66.
67. Ono M, Maruyama T, Masuda H, Kajitani T, Nagashima T, et al. Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(47): 18700–5.
68. Osteen KG, Bruner-Tran KL, Eisenberg E. Reduced progesterone action during endometrial maturation: a potential risk factor for the development of endometriosis. *Fertil Steril* 2005; 83:529-37.
69. Osuga Y, Koga K, Tsutsumi O, Igarashi T, Okagaki R, Takai Y, Matsumi H, Hiroi H, Fujiwara T, Momoeda M, Yano T, Taketani Y. Stem cell factor (SCF) concentrations in peritoneal fluid of women with or without endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44(4): 231-5.
70. Padykula HA. Regenerative in the primate uterus: the role of stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 622: 47-56.
71. Péault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Treamblay JP. Stem and progenitors cells in skeletal muscle development, maintenance and therapy. *Mol Ther* 2007; 15(5): 867-77.

72. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004; 95:9-20.
73. Pittenger MF. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol Biol* 2008; 449:27-44.
74. Pogdaec S, Abrão MS, Dias JR J, Rizzo LV, Oliveira RM, Baracat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Human Reproduction*, v. 22, p. 1373-1379, 2007.
75. Prianishnikov VA. On the concept of stem cell and a model of functional-morphological structure of the endometrium. *Contraception* 1978; 18:213– 223.
76. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255(5052):1646.
77. Revel A. Multitasking human endometrium: a review of endometrial biopsy as a diagnostic tool, therapeutic applications, and a source of adult stem cells. *Obstet Gynecol Surv* 2009; 64(4): 249-57.
78. Rojas M, Xu J, Wood CR. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33: 145-152.
79. Russel, WW. Aberrant portions of the Mullerian duct found in an ovary. Ovarian cysts of Mullerian origin. *Bull. John Hopkins Hospital* 1899; 10:8-10.
80. Sales-Pardo I, Avendanõ A, Barquinero J, Domingo JC, Marin P. The Hoechst low-fluorescent profile of the side population: clonogenicity versus dye retention. *Blood* 108(5): 1774–5. *Cells* 2006; 5(4): 339–54.
81. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination or endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14: 422-429.
82. Sasson IE, Taylor HS. Stem Cells and the Pathogenesis of Endometriosis. *Ann. N.Y. Acad Sci* 2008; 1127: 106-115.

83. Schiffrin BS. Teenage endometriosis. *Am J. Obstet. Gynecol* 1973; 116:980.
84. Schrodt, GR. Endometriosis of the male urinary system: a case report. *J. Urol* 1980; 124:723.
85. Schwab KE, Chan RW, Gargett CE. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil Steril* 2005; 84 (Suppl 2): 1124-1130.
86. Schwab KE, Gargett CE. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrial. *Hum Reprod* 2007; 22: 2903-2911.
87. Sharpe-Timms KL. Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2001; 943: 131-47.
88. Sharpe-Timms K, Zimmer RL, Ricke EA, Piva M, Horowitz GM. Endometriotic haptoglobin binds to peritoneal macrophages and alters their function in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 78: 810-9.
89. Sharpe-Timms K. Haptoglobin expression by shed endometrial tissue fragments found in peritoneal fluid. *Fertil Steril* 2005; 84: 22-30.
90. Simpson J, Elias S, Malinak L, Buttram VJ. Heritable aspects of endometriosis: genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137:327-31.
91. Starzinski-Powitz A, Zeitvogel A, Schreiner A, Baumann R. In search of pathogenic mechanisms in endometriosis: the challenge for molecular cell biology. *Curr Mol Med* 2001; 1: 655-664.
92. Starzinski-Powitz A, Zeitvogel A, Schreiner A, Baumann R. Endometriosis – a stem cell disease? *Zentrbl Gynakol* 2003; 125(7-8): 235-8.
93. Szotek PP, Chang HL, Zhang L. Adult mouse myometrial label-retaining cells divide in response to gonadotropin stimulation. *Stem Cells* 2007; 25: 1317-1325.

94. Tanaka T, Nakajima S, Umesaki N. Cellular heterogeneity in long-term surviving cells isolated from eutopic endometrial, ovarian endometrioma and adenomyosis tissues. *Oncol Rep* 2003b; 10:1155-1160.
95. Taylor HS. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA* 2004; 292:81-85.
96. Tempfer CB, Simoni M, Desteves B, Fauser BCJM. Functional genetic polymorphism and female reproductive disorders: Part II- endometriosis. *Human Reproduction Update* 2008; 19: 1-21.
97. Treolar S et al. The International Endogene Study: a collection of families for genetic research in endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 78: 685.
98. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2000; 287(5460):2032-6.
99. Van de Walle I, De Smet G, De Smedt M, Vandekerckhove B, Leclercq G, Plum J, Taghon T. An early decrease in Notch activation is required for human TCR-alpha-beta lineage differentiation at the expense of TCR-gammadelta T cells. *Blood* 2009; 113(13): 2988-98.
100. Van Gorp T, Amant F, Neven P, Vergote I. Endometriosis and the development of malignant tumours of the pelvis. A review of literature. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18:349-371.
101. Van Os R, Kamminga LM, de Haan G. Stem cell assays: something old, something new, something borrowed. *Stem Cells* 2004; 22: 1181-1190.
102. Vinatier D, Cosson M, Dufour P. Is endometriosis an endometrial disease? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 91: 113-25.
103. Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P. Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 96: 21-34.

104. Wieser F, Fabjani G, Tempfer C, Schneeberger C, Sator M, Huber J. Analysis of an interleukin-6 gene promoter polymorphism in women with endometriosis by pyrosequencing. *J Soc Gynecol Invest* 2003; 10:32-6.
105. Wolff EF. Demonstration of multipotent stem cells in the adult human endometrial by in vitro chondrogenesis. *Reprod Sci* 2007 14:524-533.
106. Wu Y, Kadjacsy-Balla A, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Jailwala P et al. Transcriptional characterizations of differences between eutopic and ectopic endometrium. *Endocrinology* 2006; 147: 232-46.
107. Zamurovic N, Cappellen D, Rohner D. Coordinated activation of Notch, Wnt and transforming growth factor-beta signaling pathways in bone morphogenic protein 2-induced osteogenesis. *J Biol Chem* 2004; 279:37704-15.
108. Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S et al. Deficient 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis in endometriosis: failure to metabolize 17 β -estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4474-80.
109. Zhang JW, Niu C, Ye L, Huang HY, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425: 836-841.
110. Zheng W, Li N, Wang J, Ulukus EC, Ulukus M, Arici A, Liang SX. Initial endometriosis showing direct morphologic evidence of metaplasia in the pathogenesis of ovarian endometriosis. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 24:164-72.

10. ANEXOS

Anexo 1 – Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº

APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO:..... Nº

APTO: BAIRRO:

CIDADE:

CEP:.....TELEFONE:

(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Expressão de genes comuns a linhagens de células tronco em mulheres inférteis com endometriose profunda

PESQUISADOR : Paula Beatriz Tavares Fettback

CARGO/FUNÇÃO: Médico observador do Centro de Reprodução Humana Governador

Mario Covas

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 117477 – SP

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☐	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☒	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 meses

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, o qual o objetivo principal visa avaliar a expressão de genes relacionados às funções de células tronco em pacientes com infertilidade e endometriose profunda, podendo contribuir para o melhor conhecimento das causas desta doença e futuramente colaborar com possíveis tratamentos.

O estudo será feito com pacientes com indicação prévia de cirurgia por vídeo-laparoscopia. Durante a cirurgia serão retirados pequenos fragmentos (pedacinhos) de endometriose menores que 1 centímetro, pedacinhos do tecido normal e da camada dentro do útero. Estes pedacinhos serão conservados para posterior análise da expressão de genes potencialmente envolvidos com função de células tronco. Não haverá nenhum prejuízo para a senhora devido a retirada desses pequenos fragmentos

A senhora fará a cirurgia de vídeo-laparoscopia por técnica comumente utilizada e previamente indicada devido dor e/ou infertilidade. Esta cirurgia consiste em fazer pequenos cortes na barriga, sendo o primeiro no umbigo com aproximadamente 2-3 centímetros e mais três pequenos cortes de 1-2 centímetros abaixo para visualizar a endometriose com uma câmera e realizar a cirurgia com os instrumentos cirúrgicos próprios da vídeo-laparoscopia. Para a retirada dos fragmentos de endometriose e da camada de dentro do útero serão aplicadas as mesmas técnicas cirúrgicas utilizadas

normalmente na prática clínica, não havendo maior risco para a senhora durante ou após o procedimento cirúrgico. Não haverá nenhum desconforto ou risco adicional para a senhora durante a realização dos procedimentos descritos e da pesquisa já que a cirurgia faz parte do tratamento para dor e/ou infertilidade que a senhora está fazendo.

Não há benefício direto para sua participação neste estudo, pois se trata de estudo experimental testando a possibilidade de que genes relacionados às funções de células tronco estariam envolvidos no desenvolvimento da endometriose. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

Como alternativa à cirurgia de vídeo-laparoscopia, que tem como objetivo a melhora da dor e da infertilidade, a senhora poderá ser submetida a um procedimento de reprodução assistida, como a fertilização *in vitro*, não havendo, no entanto, benefícios na melhora da dor.

A senhora terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.

O principal investigador é o Professor Doutor Edmund Chada Baracat e a pesquisadora executante é a Dra. Paula Beatriz Tavares Fettback, que podem ser encontrados no Instituto Central do Hospital das Clínicas – FMUSP – Avenida Doutor Enéas de Carvalho Aguiar, 255; CEP: 05403-900 São Paulo – SP – Brasil.

Telefone: (11) 30696647

Se a senhora tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar.

Telefone: (11) 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 –

E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

A senhora terá tem liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade do seu tratamento nesta instituição.

Durante todo o estudo a sua confidencialidade, sigilo e privacidade serão garantidos. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Os dados obtidos por este estudo serão utilizados somente para pesquisa.

A senhora terá o direito de ser mantida atualizada sobre os resultados parciais da pesquisa e de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não haverá despesas pessoais para a senhora em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. A senhora terá toda assistência no Hospital das Clínicas (HC-FMUSP) durante a pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

Eu, Paula Beatriz Tavares Fettback, pesquisadora responsável comprometo-me a utilizar os dados coletados somente para a pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “Expressão de genes comuns a linhagens de células tronco em mulheres inférteis com endometriose profunda”. Eu discuti com a Dra Paula Beatriz Tavares Fettback sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Anexo 2 – Aprovações **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18/02/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0977/08**, intitulado: "**EXPRESSÃO DE GENES COMUNS A LINHAGEM DE CÉLULAS TRONCO EM MULHERES INFÉRTEIS COM ENDOMETRIOSE PROFUNDA**" apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, **conforme parecer consubstanciado anexo.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

O pesquisador deverá aguardar a aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP para iniciar o estudo.

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. EDMUND CHADA BARACAT**

Pesquisador (a) Executante: **PAULA BEATRIZ TAVARES FETTBACH**

CAPPesq, 19 de Fevereiro de 2009

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo -- SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnnet.usp.br

matc

PARECER CONSUBSTANCIADO – CAPPESQ-HCFMUSP

Título: Expressão de genes comuns e linhagens de células tronco em mulheres inférteis com endometriose profunda.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

Instituição onde será realizada a pesquisa: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

Área Temática: Genética Humana, Cooperação estrangeira

Protocolo CAPPesq nº 0977/08

Trata-se de estudo prospectivo, teórico, cujo objetivo principal é avaliar a expressão de genes relacionados à biologia de células tronco em pacientes inférteis com endometriose peritoneal e comparar o padrão de expressão deste genes em lesões de endometriose profunda e superficial, peritônio normal e em endométrio tópico em pacientes inférteis com endometriose peritoneal.

Serão avaliadas, neste, um total de seis pacientes incluídas no Programa de Reprodução Assistida desenvolvido no Centro de Reprodução Humana (CRH) da Divisão de Ginecologia do HCFMUSP, que serão submetidas a laparoscopia para avaliação e tratamento de endometriose e/ou infertilidade.

As pacientes serão submetidas à laparoscopia cirúrgica. As amostras de tecido preservado terão o RNA extraído e será feita a síntese de cDNA por meio de reação de transcriptase reversa, após a qual o cDNA será submetido a PCR em tempo real com SYBR Green, que permite a amplificação e quantificação, para que seja efetuada uma análise comparativa e quantitativa dos transcritos. Todas as etapas deste estudo serão realizadas em laboratório de pesquisa localizado da Universidade de São Paulo, sendo, essas técnicas, comumente usadas na rotina deste serviço (LIM 58 da Disciplina de Ginecologia da USP).

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

A análise estatística do cálculo amostral considerou intervalo de confiança de 95% e poder da amostra de 0,8.

Os recursos necessários para o desenvolvimento do projeto serão provenientes de doação da Instituição Huntington Medicina Reprodutiva. Os procedimentos relativos à assistência médico-hospitalar serão efetuados no HC-FMUSP, caso sejam necessários.

O estudo será realizado e coordenado pela Disciplina de Ginecologia da FMUSP, em colaboração, na forma consultoria e assistência científica, com o Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Urologia e Fisiologia. Programa de Ciências Reprodutivas da Universidade de Michigan, USA. Não haverá participação estrangeira direta nas atividades de práticas clínica, cirúrgica e laboratorial a serem desenvolvidas durante a realização do projeto. O estudo não envolver remessa e/ou recebimento de material biológico para o exterior e também não está previsto o armazenamento de materiais biológicos humanos para investigações futuras.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresenta-se completo e instruído com linguagem clara e adequada, direcionado aos aspectos fundamentais sobre o estudo. Encontra-se descrita a justificativa da realização do estudo, sendo o objetivo pertinente, metodologia adequada, responsabilidade financeira positiva, os procedimentos relativos à participação do sujeito na pesquisa, riscos, desconfortos e medidas de proteção, bem como estão previstas garantias estabelecidas e preconizadas pela Resolução CNS nº196/96.

Diante do exposto a CAPPesq, de acordo com as atribuições definidas na Res. 196/96 manifesta-se pela aprovação do projeto.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa
18/02/09

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Ao

Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28.04.09 tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº **0977/08** intitulado: **"Expressão de genes comuns a linhagem de células tronco em mulheres inférteis com endometriose profunda."** será dissertação de mestrado da aluna **PAULA BEATRIZ TAVARES FETTBACH**, tendo como orientador **DR. PAULO CÉSAR SERAFINI**.

Lembramos que a aluna deverá aguardar a aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP para iniciar o estudo.

Pesquisador Responsável: **PROF. DR. EDMUND CHADA BARACAT**

CAPPesq, 28 de abril de 2009.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax: 011 - 3069 6492 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
Matc-28.04.09

Memo.CAPPesq – 272/09

São Paulo, 03 de junho de 2009.

Ilmo. Sr.
Dr. Edmund Chada Baracat
DD Pesquisador
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

Por determinação do Senhor Presidente Prof. Dr. Eduardo Massad, encaminhamos para conhecimento cópia do parecer nº **0275/2009**, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP/MS, referente à **APROVAÇÃO** do protocolo de Pesquisa nº **0977/08** – intitulado **“Expressão de genes comuns a linhagens de células tronco em mulheres inférteis com endometriose profunda”**

Solicitamos providenciar as recomendações constantes do referido parecer para análise desta CAPPesq antes de iniciar o estudo.

Atenciosamente,

Julio cesar
Secretario

**Comissão de Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa - CAPPesq**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
Julio Cesar

03 06 09 12:41

MS

33153701

P. 1

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 275/2009

Registro CONEP: 15310 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0869.0.015.000-08

Processo nº 25000.036938/2009-35

Projeto de Pesquisa: *"Expressão de genes comuns a linhagens de células tronco em mulheres inférteis com endometriose profunda".*

Pesquisador Responsável: Edmund Chada Baracat

Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP - HCFMUSP

CEP de origem: CAPPESQ-HCFMUSP

Área Temática Especial: Genética Humana com Cooperação Estrangeira.

Patrocinador: Dr. Paulo César Serafini, Diretor da Huntington Centro de Medicina Reprodutiva

Sumário geral do protocolo

A endometriose é definida pela presença e proliferação de tecido endometrial glandular e/ou estromal fora do útero. É uma doença prevalente relatada em até 10 a 15% das mulheres em idade reprodutiva. Em virtude de sua heterogeneidade é responsável por sintomas significativos e de intensidade variável como dismenorréia, dor pélvica crônica e infertilidade. Embora diversas teorias tenham sido aventadas, sua patogênese permanece ainda pouco conhecida. As células que compõem as lesões de endometriose apresentam potencial de proliferação, certo grau de indiferenciação e, por vezes, capacidade infiltrativa, que fazem supor provável origem relacionada a células tronco endometriais. Adicionalmente, a monoclonalidade de algumas lesões endometrióticas profundas, a capacidade clonogênica demonstrada em estudo de cultura de células obtidas de lesões endometrióticas e as crescentes evidências de que a endometriose pode desenvolver-se em alguns carcinomas ovarianos fortalecem a hipótese de sua origem em linhagens de células tronco. Estudos que comprovem o envolvimento das células tronco de origem endometrial ou extra-endometrial na patogênese da endometriose poderão esclarecer a etiologia desta doença, permitindo assim conhecer a sua história natural e estabelecer medidas preventivas e até mesmo novas alternativas terapêuticas.

O objetivo principal é avaliar a expressão de genes relacionados às funções de células tronco em pacientes inférteis com endometriose profunda.

O objetivo secundário é comparar o padrão de expressão de genes relacionados às funções de células tronco em lesões de endometriose profunda, lesões de endometriose superficial, peritônio normal adjacente e endométrio tóxico em pacientes inférteis com endometriose profunda.

A sua metodologia trata-se de estudo prospectivo, teórico, onde serão avaliadas um total de oito pacientes (inicialmente eram seis pacientes, elevou-se o número a oito para ajustes estatísticos) incluídas no Programa de Reprodução Assistida desenvolvido no Centro de Reprodução Humana (CRH) Governador Mário Covas da Divisão de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), que serão submetidas a laparoscopia para avaliação e tratamento de endometriose e/ou infertilidade.

As pacientes serão submetidas à laparoscopia cirúrgica. As amostras de tecido preservado terão o RNA extraído e será feita a síntese de cDNA por meio de reação de transcriptase reversa, após a qual o cDNA será submetido a PCR em tempo real com SYBR Green, que permite a amplificação e quantificação, para que seja efetuada uma análise comparativa e quantitativa dos transcritos.

Todas as etapas deste estudo serão realizadas em laboratório de pesquisa localizado na Universidade de São Paulo, sendo, essas técnicas, comumente usadas na rotina deste serviço (LIM 58 da Disciplina de Ginecologia da Universidade de São Paulo).

Os Critérios de inclusão são descritos como: Idade entre 21 – 39 anos; Pacientes com ciclos menstruais com duração entre 23 e 33 dias; Pacientes com índice de massa corpórea entre 18 e 28 kg/m²; Pacientes inférteis submetidas à laparoscopia cirúrgica por suspeita clínica de endometriose profunda como fator etiológico primário da infertilidade; Pacientes sem história prévia de cirurgia

3 06 09 12:41

MS

33153701

p. 2

Cont. do Parecer CONEP 275/08.

para endometriose; Pacientes sem antecedentes de uso de medicação hormonal nos últimos três meses que antecedem a cirurgia; Estar de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Protocolo de Pesquisa, a ser aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do HCFMUSP.

Os Critérios de exclusão incluem: Pacientes com idade ≥ 40 anos; Pacientes com cirurgia prévia para endometriose; Pacientes com contra-indicação clínica ao procedimento cirúrgico e/ou gestação; Pacientes participando de outros projetos de pesquisa.

A página 11 do Protocolo traz uma tabela (tabela 1) em que estão descritos os genes a serem investigados: São quatorze tipos de marcadores genéticos, envolvendo um total de 114 genes de regulação do ciclo celular, marcadores mesenquimais, marcadores metabólicos etc.

Apresentação do protocolo

Projeto bem elaborado e apresentado, em que fica claro que a participação estrangeira se resume no aceite da Dra. Paula Fettback, executora do Projeto, como estagiária da Escola de Medicina da Universidade de Michigan, por um período de três meses, para aperfeiçoamento de técnicas usadas em reprodução humana. (carta assinada por quatro responsáveis pelo laboratório da Universidade Americana, devidamente traduzida). Não haverá remessa de material ao exterior, nem armazenamento de material biológico.

Cronograma elaborado por trimestres, de forma a estar atualizado no momento de execução do Projeto.

Orçamento explicativo. Trata-se de rotina de tratamento a que são submetidas mulheres com problemas de endometriose, o que não acarretou em custos adicionais, sendo a quantia estipulada (R\$ 8.988,00) a necessária para compra de reagentes usados na detecção dos genes a serem investigados no Projeto por métodos empregados em Biologia Molecular.

O TCLE, apesar de um pouco extenso, está escrito em linguagem esclarecedora, e cumpre a resolução 196. Esclarece sobre a pesquisa, descreve os riscos mínimos a que a paciente é submetida a tratamentos de endometriose e esclarece sobre a não inclusão de riscos adicionais decorrentes da participação da paciente na pesquisa. Não diz sobre indenizações, mas esclarece que se houver algum dano pessoal diretamente causado pelo procedimento ou tratamento proposto, a participante terá direito a tratamento médico na Instituição (HCFMUSP). Comprometimento de uso do material a ser coletado apenas para os fins da Pesquisa proposta, autonomia de a paciente retirar-se da Pesquisa, sem prejuízo no tratamento, etc. foram também observados no TCLE.

Comentários/ Considerações

Não consta Declaração emitida pela pesquisadora principal informando que os dados obtidos no estudo serão tornados públicos, sejam eles informativos ou não. Esta situação poderá ser resolvida pelo CEP responsável pelo Projeto.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento das questões acima, antes do início do estudo.

Situação : Projeto aprovado com recomendação.

Brasília, 27 de maio de 2009.

Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

2/2

RECEBIDO
DATA 03.06.09
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
HCFMUSP

Anexo 3 - Cálculo da expressão gênica pelo método delta-delta Ct ($\Delta\Delta C_t$)

- Limiar (“Threshold”)

O software usa um parâmetro chamado “threshold” (limiar) para definir o nível de fluorescência de RT-PCR detectável. Baseado no número de ciclos requeridos para cruzar o limiar, o software compara as amostras testadas quantitativamente: uma amostra com maior número de cópias inicial cruzará o limiar mais cedo do que uma amostra com um menor número de cópias inicial do alvo.

Figura 6 - Exemplo de curva de amplificação representativa dos ciclos da Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase dos genes

- Ct (“Cycle Threshold”)

O Ct de uma determinada amostra corresponde ao ciclo de PCR em que esta cruzou o limiar (“threshold”). O valor de Ct depende da quantidade inicial de alvo, e da eficiência de amplificação. O nível de expressão de cada gene foi calculado pelo método de delta-delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$):

- ΔCt (delta Ct) = Ct gene – Ct gene de controle (housekeeping gene);
- Normalizacao dos valores de ΔCt : Cálculo da média S: Média do ΔCt (Gráfico 1);
- $\Delta\Delta\text{CT}$ (delta-delta CT): ΔCT - média S

Gráfico 1 - Gráfico demonstrando a normalização dos valores delta Ct