

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA EM ENDOMETRIOSE**

LUCIANA CARICATI VEIGA CASTELLI

RIBEIRÃO PRETO – SP  
2008

*Luciana Caricati Veiga Castelli*

**HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA EM ENDOMETRIOSE**

**COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION IN ENDOMETRIOSIS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP  
como requisito parcial para obtenção do título de  
Doutor em Ciências, Área de Concentração:  
Genética

Orientadora: Profa Dra Lucia Regina Martelli

RIBEIRÃO PRETO – SP  
2008

## FICHA CATALOGRÁFICA

Veiga-Castelli, Luciana Caricati

Hibridação genômica comparativa em endometriose. Ribeirão Preto, 2008.

111 p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Martelli, Lucia Regina.

1. Endometriose. 2. Hibridação Genômica Comparativa. 3. Citogenética. 4. Infertilidade.

# FOLHA DE APROVAÇÃO

**Luciana Caricati Veiga Castelli**

Hibridação genômica comparativa em endometriose

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP  
como requisito parcial para obtenção do título de  
Doutor em Ciências, Área de Concentração:  
Genética

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Martelli

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Ao Erick

Aos meus pais Marisa e José Alberto

À minha avó Flora

## AGRADECIMENTOS.....

À Profa Dra Lucia Regina Martelli, por me receber em seu laboratório, pelos ensinamentos, pelas oportunidades, pela amizade, e pelo estímulo em continuar estudando Citogenética.

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. À Susie e Maria Aparecida, secretárias do Departamento de Genética, pela atenção.

Ao Dr Rui Ferriani e Dr Julio César Rosa e Silva, pelas amostras e dados clínicos das pacientes.

Às pacientes, por aceitarem participar deste estudo.

Ao Dr Luiz Gonzaga Tone, pela colaboração neste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA-HCFMRP), pelo auxílio financeiro.

Ao Dr Jeremy Squire, por me receber em seu laboratório no Princess Margareth Hospital, University Health Network, Toronto, ON, Canadá, e pela preciosa colaboração durante todo este trabalho.

À Dra Maisa Yoshimoto, pelas sugestões durante toda a parte experimental deste trabalho, e pelo imenso auxílio durante meu estágio em Toronto. Agradeço também a toda a equipe do Squire Lab, Princess Margareth Hospital, Toronto, Canadá.

A todos os professores, funcionários e alunos do Bloco C do Departamento de Genética, pelo apoio e pela agradável convivência diária. Meu agradecimento especial à querida amiga Juliana Meola, pelo companheirismo sem igual desde o primeiro dia do nosso doutorado. Agradeço também a amiga Maria Silvina Juchniuk de Vozzi, que tantas vezes me auxiliou no laboratório.

Aos professores Dr Raysildo Barbosa Lôbo e Dra Ester Silveira Ramos, pelas sugestões e pelo apoio.

Ao técnico de laboratório Silvio Avelino dos Santos, por toda sua colaboração e amizade no dia-a-dia deste trabalho. Muito obrigada!

Às técnicas de laboratório Lucimar Aparecida Laureano e Maria Lucia Machado, por estarem sempre dispostas a ajudar na análise citogenética.

À querida amiga Dra Elida Paula Benquique Ojopi, pela amizade e sugestões durante meu trabalho.

Às queridas amigas de Botucatu, que mesmo à distância acompanharam todo o meu trabalho: Érica Cardoso, Juliana Simões, Perla Reibsheid, Isabela Piza, Mônica Rosolem, Bianca Sansone, Karilla Sansone e Fabiana Sansone.

Aos meus sogros Gilberto e Angela Castelli, por me receberem em Ribeirão Preto no início deste trabalho e pelo carinho.

À toda minha família, em especial minha avó Flora, minha tia Silvia, meu irmão Beto e meus padrinhos Toninho e Sônia Simões, pelo estímulo e carinho sempre.

Aos meus pais Marisa e José Alberto, por serem meus exemplos de caráter, integridade, respeito e amor.

Ao Erick, por seu apoio, companheirismo e amor em todos os momentos. Obrigada por tudo....

A Deus, por mais esta página da minha vida.

Meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A endometriose é uma doença ginecológica benigna comum, mas agressiva, caracterizada pela presença de tecido endometrial ectópico. A teoria mais aceita para explicá-la é a teoria de Sampson, na qual o tecido endometrial descamado durante a menstruação sofre refluxo através das tubas uterinas, adere e se prolifera em sítios ectópicos da cavidade peritoneal. Por outro lado, apenas o refluxo tubário não é capaz de estabelecer a doença e vários estudos sugerem uma etiologia multidimensional incluindo fatores hereditários, hormonais e imunológicos. Várias metodologias têm sido propostas com o objetivo de identificar genes candidatos para a endometriose. A hibridação genômica comparativa (CGH) é uma técnica que permite que o genoma inteiro seja analisado em um só experimento, sem a necessidade de cromossomos metafásicos obtidos por cultura celular. Nossa proposta foi avaliar, por CGH, amostras de endometriomas ovarianos e de tecido endometrial eutópico de dez pacientes com diagnóstico firmado de endometriose, para *screening* do genoma. No grupo eutópico, 6/10 amostras apresentaram alterações caracterizadas por perdas ou ganhos de regiões cromossômicas e no grupo ectópico foram encontradas alterações em 7/10 casos. A presença de perdas e ganhos de regiões cromossômicas no endométrio eutópico, histologicamente normal, de mulheres com endometriose ovariana, pode ser considerada como alteração primária ao desenvolvimento da doença. A metodologia de CGH permitiu a detecção das regiões cromossômicas 11q12.3-q13.1, 17p11.1-p12 e 17q25.3-qter como regiões críticas, direcionando investigações futuras para identificação de genes associados à endometriose.

Palavras-chave: endometriose, hibridação genômica comparativa, citogenética, infertilidade.



## **ABSTRACT**

### *Comparative genomic hybridization in endometriosis*

Endometriosis is a common benign gynecological disease, very aggressive, characterized by the presence of ectopic endometrial tissue. The most accepted theory to explain it is Sampson's implantation theory, which says that the endometrial tissue exfoliated during menstruation undergoes reflux through the uterine tubes, adheres and proliferates in ectopic sites of the peritoneal cavity. On the other hand, only reflux is not enough to the establishment of the disease and a number of studies suggest a multidimensional etiology including hereditary, hormonal and immunological factors. Several methodologies have been proposed for the identification of candidate genes for endometriosis. The comparative genomic hybridization (CGH) is a versatile technique that allows the entire genome to be analyzed in only one experiment without the necessity of metaphasic chromosomes from the sample, excluding the cell culture. We aimed to evaluate, by CGH, ovarian endometriomas and eutopic endometrial tissue samples from 10 patients with confirmed diagnosis of endometriosis, for a genomic screening. In the eutopic group, 6/10 samples presented genomic imbalances and 7/10 cases showed alterations in the ectopic group. The presence of losses and gains of chromosomic regions in the histologically normal eutopic endometrium from women with ovarian endometriosis can be considered as a primary alteration in the development of the disease. The CGH methodology allowed the detection of chromosomic regions 11q12.3-q13.1, 17p11.1-p12 and 17q25.3-qter as critical regions, leading to future investigations for the identification of genes associated to endometriosis.

Keywords: endometriosis, comparative genomic hybridization, cytogenetics, infertility.

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
ENDOMETRIOSE .....	12
ENDOMETRIOMA OVARIANO E TUMORES DE OVÁRIO .....	18
ENDOMETRIOSE E INFERTILIDADE.....	22
INVESTIGAÇÃO DIAGNÓSTICA.....	24
HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA E ENDOMETRIOSE.....	26
GENES CANDIDATOS EM ENDOMETRIOSE .....	29
<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>35</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
CASUÍSTICA.....	39
MATERIAL.....	40
MÉTODOS.....	41
<i>Preparação das Células Metafásicas.....</i>	<i>41</i>
<i>Extração de DNA de tecido endometrial.....</i>	<i>42</i>
<i>Amplificação e Marcação do DNA por SCOMP.....</i>	<i>43</i>
<i>Hibridação Genômica Comparativa.....</i>	<i>45</i>
<i>Análise de Imagens.....</i>	<i>47</i>
<i>Análise por Bioinformática.....</i>	<i>48</i>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>
<b>MANUSCRITO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO.....</b>	<b>88</b>

# ***Introdução***

## INTRODUÇÃO

De acordo com Berne e Levy (1990) o ciclo menstrual apresenta três fases fisiologicamente distintas: a fase folicular, começando no primeiro dia do sangramento menstrual, com duração variável; a fase ovulatória, com duração média de dois dias e a fase luteínica, com duração de 13 a 14 dias, terminando com o início de um novo período menstrual. Esse ciclo normalmente varia de 21 a 35 dias, dependendo da duração da fase folicular. O ciclo começa com aumento gradativo do nível de FSH (hormônio folículo estimulante) pouco antes do início da menstruação, que se mantém durante a primeira metade da fase folicular. Em seguida observa-se um aumento do nível de LH (hormônio luteinizante). Durante a segunda metade da fase folicular, o nível de FSH diminui rapidamente, porém o LH continua aumentado. Devido ao estímulo do FSH, a concentração de estradiol no sangue também aumenta gradativamente durante os primeiros 6 a 8 dias do ciclo, aumentando progressivamente e atingindo um pico antes da fase ovulatória. Os níveis elevados de estradiol exercem efeito de *feedback*, diminuindo a concentração de FSH no sangue durante a segunda metade da fase folicular. Em seguida, a fase ovulatória é caracterizada por um pico elevado de LH no sangue, que precede um aumento do nível plasmático de progesterona. Após a ovulação, durante a fase luteínica, os níveis de LH e FSH diminuem até o final desta fase devido ao *feedback* negativo dos hormônios esteróides produzidos pelo corpo lúteo. Esta fase é caracterizada pelo intenso aumento dos níveis plasmáticos de progesterona e pelo aumento do estradiol, ambos secretados pelo corpo lúteo. Na ausência de gravidez, o corpo lúteo é degenerado, levando à queda dos níveis de progesterona e estradiol até seus

níveis mínimos ao final da fase luteínica. A secreção de FSH aumenta, dando início a um novo ciclo menstrual.

No início de cada ciclo menstrual, o endométrio apresenta-se fino, com poucas e retilíneas glândulas. Ao final da menstruação, a elevação da concentração plasmática de estradiol durante a fase folicular aumenta de três a cinco vezes a espessura do endométrio, caracterizando a fase proliferativa. O estradiol altera o muco produzido no colo uterino, tornando-o mais aquoso, elástico e produzido em maior quantidade, o que irá facilitar a entrada dos espermatozóides na cavidade uterina. Logo após a ovulação, o aumento acentuado de progesterona altera o endométrio, inibindo seu crescimento rápido e atividade mitótica e provocando aumento da secreção das glândulas. Essas alterações, características da fase secretora, permitem a implantação e nutrição do embrião no endométrio. Ao mesmo tempo, a progesterona diminui a quantidade de muco cervical, que volta a ser espesso e não-elástico. Caso não haja concepção, a queda brusca de progesterona e estradiol leva a contrações espasmódicas das artérias espiraladas e esta perda do suprimento sanguíneo produz morte celular e conseqüente descamação dessas células com o sangue coagulado, constituindo o fluxo menstrual.

### ***Endometriose***

A endometriose é uma doença ginecológica benigna comum, embora bastante agressiva, caracterizada pela presença de tecido endometrial ectópico, i.e., tecido endometrial implantado fora da cavidade uterina (Yang *et al.*, 2004). Histologicamente, o tecido ectópico é idêntico ao normal (eutópico), diferenciando-se

apenas por aspectos funcionais e bioquímicos como receptividade a esteróides e potencial invasivo (Gaetje *et al.*, 1995).

A endometriose é caracterizada por sintomas como dismenorréia, dispneúria, dor pélvica e infertilidade (Poliness *et al.*, 2004). No entanto, muitas mulheres são assintomáticas (Nap *et al.*, 2004).

Embora a endometriose seja uma das alterações ginecológicas mais estudadas, sua etiologia e origem ainda não foram esclarecidas. A teoria mais aceita para explicá-la é a teoria da implantação de Sampson (1927), a qual postula que o tecido endometrial liberado durante a menstruação sofre refluxo através das tubas uterinas, adere-se e prolifera em locais ectópicos da cavidade peritoneal (principalmente peritônio, ovários e septo retovaginal). No entanto, as teorias da metaplasia do epitélio celômico, da indução, dos restos embrionários, da imunidade celular alterada e da metástase das lesões, também têm sido consideradas (Witz, 1999; Giudice e Kao, 2004).

Vários estudos epidemiológicos sustentam a teoria de Sampson. Ciclos menstruais curtos e longa duração do fluxo menstrual são considerados dois fatores de risco predominantes para a endometriose. Também se sugere que pacientes nulíparas ou com menarca precoce apresentem um maior risco para desenvolver a doença (Darrow *et al.*, 1993; Missmer e Cramer, 2003). Acredita-se que em torno de 10% da população feminina (Dabrosin *et al.*, 2002) e 50% das pacientes com infertilidade e dor pélvica (Cornillie *et al.*, 1990) apresentem endometriose. Essa incidência aumenta durante a idade reprodutiva, é rara antes da menarca e tende a diminuir após a menopausa (Houston *et al.*, 1988). Também foi relatada uma

tendência poligênica e multifatorial para a endometriose, sendo estimado maior risco (5 a 8%) para mulheres com história familiar da doença em parentes de primeiro grau (Bischoff e Simpson, 2004), bem como uma concordância aumentada entre irmãs gêmeas (Hadfield *et al.*, 1997). Ainda, o fluxo menstrual retrógrado foi descrito na literatura em 76% das mulheres submetidas à laparoscopia durante o período menstrual (Liu e Hitchcock, 1986) bem como a viabilidade do endométrio menstrual em cultura (Keettel e Stein, 1951) e a capacidade do endométrio menstrual de se fixar e proliferar em locais ectópicos (Ridley e Edwards, 1958).

Por outro lado, considerando-se a menstruação retrógrada como um fenômeno bastante comum, o fato de apenas parte das mulheres desenvolverem endometriose ainda não foi esclarecido. Foi proposto que, em mulheres saudáveis, a maioria das células menstruais sofre morte celular programada e não sobrevive (Gebel *et al.*, 1998). Entretanto, a porcentagem de células endometrióticas menstruais que sofre apoptose em mulheres com endometriose é bastante reduzida, levando a um aumento do número de células que sobrevivem e que poderiam continuar apresentando atividade fisiológica. Esses autores também observaram que o tecido endometrial de mulheres com endometriose é significativamente menos susceptível à apoptose espontânea do que o tecido endometrial de controles férteis.

Healy e colaboradores (1998) sugeriram que o endométrio de mulheres com endometriose sofre um aumento da proliferação celular e da capacidade de se implantar e sobreviver em locais ectópicos. Os autores chamaram a atenção para a proliferação endotelial aumentada, considerando-se que a angiogênese é essencial para a sobrevivência do endométrio fora do útero, além do fato de a angiogênese

excessiva não ser encontrada apenas na endometriose, mas também em uma variedade de doenças como tumores sólidos, artrite reumatóide e psoríase.

A expressão do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) em implantes endometrióticos evidenciou um mecanismo para a neovascularização, que é comumente observada ao redor dessas lesões (Donnez *et al.*, 1998). Altas concentrações de VEGF-A também foram identificadas no fluido peritoneal de mulheres com endometriose, apresentando níveis mais elevados durante a fase proliferativa do ciclo (Mclaren *et al.*, 1996). Tan e colaboradores (2002) relataram uma correlação positiva entre a severidade da endometriose e a concentração de VEGF-A no fluido peritoneal. Em 2006, Ferrero e colaboradores revisaram vários agentes anti-fator de crescimento endotelial vascular e outras drogas angiostáticas como TNP470, endostatinas, anginex e anticorpo anti-VEGF humana, que foram estudadas em laboratório e em modelos animais de endometriose. Os autores concluíram que esses agentes inibem significativamente a resposta angiogênica e reduzem o estabelecimento, manutenção e progressão das lesões endometrióticas. Por outro lado, a segurança e eficácia dessas substâncias antiangiogênicas deveriam ser avaliadas em um modelo primata não-humano de endometriose, visando futuras aplicações.

Al-Fozan e Tulandi (2003) avaliaram a distribuição lateral da endometriose e do endometrioma ovariano em mulheres com endometriose. Os autores observaram que a endometriose é mais freqüente na hemi-pelve esquerda (64,3%) em relação à direita, bem como um maior número de implantes endometrióticos no lado esquerdo da pelve. Essa predisposição poderia ser explicada pela presença do cólon sigmóide



no lado esquerdo da cavidade abdominal. Segundo essa teoria, ele retarda a passagem do fluxo menstrual retrógrado, fazendo com que as células endometrióticas tenham mais tempo para se implantar na hemi-pelve esquerda. As observações apóiam a teoria de que a origem da endometriose está nas células endometrióticas que sofreram refluxo. No entanto, suas implicações clínicas permanecem desconhecidas.

Por outro lado, apenas o refluxo tubário não é suficiente para o estabelecimento da doença e vários estudos sugerem uma etiologia multidimensional incluindo fatores hereditários, hormonais e imunológicos (Olive e Schwartz, 1993; Brinton *et al.*, 1997). Em nível celular, a doença é caracterizada por crescimento monoclonal e pode apresentar aspectos de comportamento maligno como invasão local e metástase (Olive e Schwartz, 1993; Jimbo, Hitomi *et al.*, 1997; Jimbo, Yoshikawa *et al.*, 1997). Estima-se que a patogênese da endometriose esteja associada à capacidade das células endometrióticas em reagir a uma resposta imunológica local. Vários resultados de estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que as respostas imunológicas desencadeadas pela endometriose assemelham-se às respostas de células tumorais que evadiram a imunovigilância (Braun e Dmowski, 1998). Sugere-se que células *natural killer* (NK), por exemplo, inibam a implantação ectópica e o crescimento de células endometrióticas menstruais retrógradas e, conseqüentemente, uma falha nesse sistema possa contribuir para a iniciação e progressão da endometriose (D'hooghe *et al.*, 1995). Outras características moleculares da doença incluem alguns genes superexpressos como *c-MYC* (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog [avian]*) e *ERBB2* (*v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog*

[avian]) (Bergqvist *et al.*, 1991; Schenken *et al.*, 1991) e a desregulação da expressão de fatores de crescimento (Huang e Yeh, 1994).

Dados epidemiológicos, cirúrgicos e patológicos questionam se as lesões peritoneais, ovarianas e do septo retovaginal apresentam uma etiologia comum única ou se representam três entidades com patogêneses diferentes (Vigano *et al.*, 2004). Embora a teoria do fluxo retrógrado seja a mais aceita, outros autores (Nisolle e Donnez, 1997) sugerem uma origem diferente para cada um dos três tipos de endometriose. A endometriose peritoneal realmente poderia ser explicada pela teoria do refluxo de células menstruais do endométrio que sofreriam adesão e proliferação na cavidade peritoneal. No entanto, a metaplasia celômica de inclusões epiteliais invaginadas poderia ser responsável pelo desenvolvimento da endometriose ovariana, já que o epitélio de revestimento do ovário apresenta grande potencial metaplásico. Por fim, o nódulo endometriótico retovaginal poderia ser mais bem explicado pela metaplasia de remanescentes mullerianos localizados no septo retovaginal.

A endometriose sofre transformação maligna em uma frequência que varia de 0,7% a 1%; no entanto, esta frequência pode ser considerada maior, uma vez que o tumor pode destruir o tecido endometriótico de origem e eliminar as evidências histopatológicas da endometriose (Nishida *et al.*, 2000). Os três critérios definidos para a transformação maligna da endometriose são: (a) a presença de endometriose e carcinoma no mesmo ovário; (b) o carcinoma deve ter sua origem no tecido endometriótico, porém sem invasão endometrial, mantendo limites nítidos entre

ambos e (c) a confirmação histopatológica de uma transição entre a endometriose e o carcinoma (Sampson, 1925).

### ***Endometrioma Ovariano e Tumores de Ovário***

Dada a complexidade da doença e as limitações para a determinação de sua causa, três modelos diferentes foram propostos para explicar a origem do endometrioma ovariano típico (Vigano *et al.*, 2004): invasão do córtex ovariano e invaginação progressiva após o acúmulo de *debris* menstruais derivados de hemorragia de implantes endometrióticos superficiais; envolvimento de cistos ovarianos funcionais por implantes endometrióticos localizados na superfície do ovário; e metaplasia celômica, que propõe a transformação metaplásica de células mesenquimais submesoteliais em um fenótipo endometriótico.

De modo geral, a endometriose não parece estar associada a maior risco para câncer. Por outro lado, evidências têm sugerido a endometriose ovariana como fator precursor de tipos específicos de câncer de ovário. Esta informação corrobora o fato de fatores de risco para endometriose e malignização ovariana serem similares e incluírem menarca precoce, menstruação regular, ciclos menstruais curtos e poucas gestações. Embora nenhum estudo forneça uma evidência genética conclusiva para sustentar uma linhagem celular comum entre a endometriose e o câncer de ovário, a endometriose de ovário tem sido relacionada a alterações genéticas e é freqüentemente encontrada em associação com carcinomas ovarianos endometriais e de células claras, sugerindo que esses dois tipos de carcinoma possam ter surgido diretamente de depósitos endometrióticos (Feeley e Wells, 2001). McMeekin e

colaboradores (1995) descreveram uma série de pacientes com adenocarcinomas endometrióticos associados à endometriose (EAEA) onde 30% dos tumores de adenocarcinomas endometrióticos do ovário (ECO) surgiram em associação à endometriose, uma proporção levemente maior do que a relatada na maioria das séries de pacientes. Este dado pode refletir um maior reconhecimento da ligação entre endometriose e adenocarcinoma endometriótico. A associação entre a doença no estágio inicial, idade precoce e o EAEA sustenta a idéia de que o EAEA é um subtipo histológico distinto do ECO, com um comportamento biológico menos agressivo em relação ao adenocarcinoma endometriótico típico. De acordo com os autores, a relação entre os dados histológicos associados e o estadió da doença foi menos clara. Um número substancial de casos de ECO apresentou uma mistura de elementos epiteliais em proporções variadas, juntamente com o componente endometriótico.

A associação entre endometriose e câncer ovariano também foi investigada em estudos caso-controle (Ness *et al.*, 2000; Ness *et al.*, 2002; Modugno *et al.*, 2004). A maioria desses estudos sugere uma associação entre endometriose e câncer ovariano, embora seja difícil quantificar o efeito com precisão, devido a variações de risco.

Valenzuela e colaboradores (2007) apresentaram uma análise retrospectiva de 22 casos de carcinoma ovariano endometrióide em uma tentativa de identificar a endometriose e sua transformação maligna. A endometriose foi detectada em três casos ( $3/22 = 14\%$ ), sendo que um deles apresentou claramente uma área de transformação benigna-maligna e em outro, a zona de transição era abrupta e

estava presente em ambos os ovários. No terceiro caso, foi observada endometriose ovariana com carcinoma endometriótico apenas focal. Todas as três pacientes apresentavam um componente de carcinoma ovariano de células claras. A presença desse componente foi significativamente maior em pacientes com endometriose do que em pacientes sem endometriose. Os autores sugerem a associação desta condição com os carcinomas endometrióides e de células claras do ovário e que a mesma deve ser considerada sempre que haja suspeita de diagnóstico de endometriose, independentemente da situação pré- ou pós-menopausa da paciente.

A literatura relata o comportamento clínico e os fatores prognósticos em pacientes com câncer de ovário com ou sem endometriose concomitante. Pacientes com endometriose tendem a ser mais jovens e a ser diagnosticadas em estágios precoces, com lesões de grau mais baixo e melhor prognóstico (Depriest *et al.*, 1992; Mcmeekin *et al.*, 1995; Erzen e Kovacic, 1998; Komiyama *et al.*, 1999; Erzen *et al.*, 2001). Entretanto, ainda não foi totalmente esclarecido se o aumento da sobrevida está relacionado à idade precoce e/ou ao diagnóstico precoce relatado em mulheres com endometriose (Somigliana *et al.*, 2006).

Outros autores (Komiyama *et al.*, 1999) avaliaram retrospectivamente dados clinicopatológicos da associação entre carcinoma ovariano de células claras e endometriose pélvica em 35 pacientes japonesas. Os autores observaram que pacientes com carcinoma ovariano de células claras e endometriose pélvica exibiram um melhor prognóstico em relação àquelas sem endometriose, especialmente as pacientes com câncer de grau I. Eles também sugeriram que alguma interação ou via metabólica poderia existir entre o carcinoma ovariano de células claras e a

endometriose pélvica, ajudando a inibir a proliferação ou disseminação do carcinoma ovariano de células claras para a cavidade intraperitoneal nos eventos iniciais da progressão do câncer.

A hipótese de que andrógenos circulantes possam estar envolvidos no desenvolvimento do câncer de ovário já foi relatada (Risch, 1998). A medicação androgênica, danazol, e a medicação antiandrogênica, leuprolide e nafarelin, são comumente usadas no tratamento da endometriose (Moghissi, 1999; Olive e Pritts, 2001). Cottreau e colaboradores (2003) avaliaram as associações entre o uso desses medicamentos e o câncer de ovário, e concluíram que o danazol aumentava o risco de câncer ovariano, sustentando a hipótese de que o excesso de andrógeno possa estar associado ao desenvolvimento de câncer ovariano.

Mulheres com endometriose parecem apresentar um risco maior para outros tumores malignos da pelve (Blumenfeld, 2004; Van Gorp, 2004). A ocorrência simultânea de endometriose e câncer ovariano e carcinoma de células claras (41%) e subtipos endometrióticos (38%) sugere uma transformação de componentes da endometriose em células tumorais. Esta transformação pode ser devida à perda de heterozigose e à mutação somática de genes supressores tumorais, em especial, *PTEN/MMAC1/TEP1* (Jimbo, Hitomi *et al.*, 1997; Jimbo, Yoshikawa *et al.*, 1997; Obata *et al.*, 1998; Toki e Nakayama, 2000; Swiersz, 2002). Dados da literatura também mostram uma alta frequência de mutação do gene supressor tumoral *TP53* em endometriose atípica e câncer ovariano relacionado à endometriose (Sainz De La Cuesta *et al.*, 2004). Cistos endometrióticos também apresentam perda de heterozigose e deleções parciais envolvendo os cromossomos 9p, 11q e 22q (Jiang *et*

*al.*, 1996). Clonalidade e altos níveis de aneuploidia têm sido sugeridos como fatores de predisposição para transformação maligna de lesões endometrióticas, especialmente para os subtipos endometrióide e de células claras (Jimbo, Hitomi *et al.*, 1997; Jimbo, Yoshikawa *et al.*, 1997; Tamura *et al.*, 1998; Blumenfeld, 2004). Entretanto, também foi relatado que mutações no *TP53* não estavam associadas à endometriose (Omori *et al.*, 2004), enfatizando a necessidade de novos estudos para uma avaliação precisa de regiões críticas envolvendo genes candidatos para endometriose.

Desde que a endometriose foi associada à infertilidade, a associação entre a doença e o câncer deve ser interpretada com cautela, já que um risco aumentado pode ser devido à nuliparidade e não à endometriose em si (Somigliana *et al.*, 2006).

Em resumo, a literatura relata várias evidências indicando que o mesotélio da superfície ovariana normal desempenha um papel complexo na fisiologia ovariana, com funções reguladoras proteolíticas, de síntese e crescimento, as quais influenciam na ovulação e no reparo a danos ovulatórios (Feeley e Wells, 2001). Dessa forma, é possível que aberrações dessas funções contribuam para o desenvolvimento da malignidade.

### ***Endometriose e Infertilidade***

As várias questões fisiopatológicas e terapêuticas a respeito da associação endometriose-infertilidade permanecem não esclarecidas até o momento. O

mecanismo dessa associação é complexo, devido aos polimorfismos clínicos e à ausência de confirmações bem estabelecidas.

A literatura relata que 25 a 50% das mulheres inférteis apresentam endometriose e que 30% a 50% das mulheres com endometriose são inférteis (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2004). A hipótese de que a endometriose cause infertilidade ou uma diminuição na fertilidade permanece controversa. Vários mecanismos têm sido propostos no intuito de esclarecer a associação entre endometriose e infertilidade: alterações anatômicas, alterações citológicas e bioquímicas do líquido peritoneal, alterações da resposta imune local, alterações funcionais do ovário e do endométrio e redução da qualidade do embrião (Collinet *et al.*, 2006). No entanto, deve ser enfatizado que nenhum desses mecanismos diminui confirmadamente a fertilidade feminina.

As classificações da American Society for Reproductive Medicine (1997) são únicas porque fornecem uma forma padronizada de registro dos dados patológicos e avaliam, em escala, o *status* da doença na tentativa de prever a probabilidade de gravidez após o tratamento. De acordo com os critérios da Sociedade Americana, o formulário de classificação da endometriose inclui o registro de informações sobre a morfologia da doença, recomendando fotografias coloridas para documentação. As lesões devem ser categorizadas como vermelhas, brancas e negras. A porcentagem de envolvimento da superfície em cada tipo de lesão deve ser documentada. Além disso, para aumentar a precisão do sistema de pontuação, um endometrioma ovariano deve ser confirmado por histologia ou pela presença de (a) tamanho do cisto < 12 cm; (b) adesão à parede lateral pélvica; (c) lesões de endometriose na superfície ovariana; (d) fluido persistente, espesso, cor de chocolate. De acordo com



esse sistema de pontuação, a endometriose é classificada em grau I (mínima, de 1 a 5 pontos), II (leve, de 6 a 15 pontos), III (moderada, de 16 a 40 pontos) ou IV (severa, mais de 40 pontos). É provável que os esquemas de classificação para endometriose continuem a evoluir e que outros fatores associados à endometriose que contribuam para a infertilidade sejam incluídos na classificação, permitindo uma previsão mais precisa de gravidez.

### ***Investigação Diagnóstica***

O diagnóstico inicial da endometriose é realizado pela história clínica, variando desde ausência completa de sintomas até dor pélvica incapacitante durante o período menstrual e infertilidade. A dosagem das glicoproteínas séricas CA-125 e CA19-9, devido à maior concentração desses marcadores no endométrio ectópico comparado ao normal, em associação a exames de imagem como ultra-som endovaginal e ressonância magnética também são utilizadas como ferramentas diagnósticas. Entretanto, devido à baixa especificidade desses métodos, o diagnóstico da endometriose só pode ser confirmado por laparoscopia, considerada um método bastante invasivo (Brosens *et al.*, 2004).

A remoção cirúrgica das lesões melhora significativamente alguns sintomas, como a dor, porém pode haver recorrência da doença e as pacientes podem rejeitar ou adiar uma segunda cirurgia, preferindo outro tipo de terapia. No momento, dentre os tratamentos disponíveis estão os supressores da síntese de estrógeno, que induzem a atrofia de implantes ectópicos ou interrompem o ciclo de estimulação. Contraceptivos orais, agentes androgênicos, progesterona e análogos do hormônio

liberador de gonadotrofina também têm sido utilizados com sucesso no tratamento da endometriose, porém nenhuma dessas drogas elimina a doença, e em alguns casos, os efeitos colaterais provocados limitam seu uso a longo prazo (Ferrero *et al.*, 2006).

Atualmente, a avaliação histológica do endométrio durante a investigação de rotina para infertilidade feminina não tem sido recomendada. O conceito de anormalidades endometriais, não refletido pelas alterações histológicas, tem enfatizado as deficiências analíticas não diagnosticadas pela avaliação histológica clássica, que podem levar à falha de implantação embrionária. De fato, a relação entre as alterações bioquímicas e a histologia normal enfatiza a necessidade de uma abordagem molecular do endométrio, além da análise histológica, para testes diagnósticos de fertilidade em mulheres com endometriose e outras causas de infertilidade (Giudice e Kao, 2004).

Um dos maiores desafios da investigação genética da endometriose é a busca por métodos de análise precisos e rápidos que revelem o máximo de informação sobre a amostra. As técnicas de citogenética convencional permitem uma informação detalhada sobre cada cromossomo e, portanto são bastante utilizadas com sucesso. Entretanto, a necessidade de obtenção de células metafásicas requer um número significativo de células vivas para cultura, e dessa forma, a dificuldade de se obter preparações cromossômicas metafásicas de boa qualidade e o tempo de cultura celular prejudicam a aplicação desta metodologia.

A técnica de Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH) é uma boa opção, pois células interfásicas podem ser analisadas com sondas específicas para determinadas

regiões cromossômicas, evitando assim a cultura celular e reduzindo o tempo para a obtenção dos resultados. Por outro lado, o número de cromossomos que pode ser avaliado por FISH no mesmo experimento é limitado devido à probabilidade de falha na hibridação e sobreposição de sinais fluorescentes de dois cromossomos. Hibridações seqüenciais, ou seja, mais de uma hibridação na mesma célula com sondas para cromossomos diferentes, também têm sido usadas para aumentar o número de cromossomos a serem investigados. No entanto, a eficiência da hibridação diminui consistentemente a cada ciclo de hibridação (Liu *et al.*, 1998).

A Hibridação Genômica Comparativa (CGH) é um método que permite a produção de um mapa detalhado das diferenças entre cromossomos em diferentes células, sem qualquer conhecimento prévio sobre as regiões alteradas. Este método detecta ganhos (amplificações) e perdas (deleções) de segmentos de DNA. A CGH tem o potencial de investigar o acúmulo de alterações cromossômicas como uma medida da estabilidade genética, bem como de monitorar as complexas alterações citogenéticas detectadas em doenças humanas (Squire e Perlikowski, 1998).

### ***Hibridação Genômica Comparativa e Endometriose***

Nenhuma alteração cromossômica específica foi identificada em tecido endometriótico por análise citogenética convencional, provavelmente devido às limitações relacionadas à cultura de tecido (Dangel *et al.*, 1994). A técnica de FISH tem a vantagem de não exigir cultura de células endometriais, já que pode ser realizada em tecido fresco ou fixado (Vigano *et al.*, 2006). Shin e colaboradores (1997) relataram que a freqüência de aneuploidia foi significativamente mais alta em

três de quatro amostras frescas de endometriose provenientes de mulheres afetadas pela doença em estadios avançados (8,8 e 14,8% respectivamente para monossomia dos cromossomos 16 e 17 em um caso; 14,8% para trissomia do cromossomo 11 no segundo caso e 14,1% para monossomia do cromossomo 16 no terceiro caso) quando comparado à frequência média observada em amostras de tecido normal (3,4% para monossomia e 1,2% para trissomia). A CGH é uma técnica versátil que supre as deficiências do FISH e da citogenética convencional, permitindo que o genoma inteiro seja analisado em um só experimento, sem a necessidade de cromossomos metafásicos da amostra. (Kallioniemi *et al.*, 1992).

Resumidamente, na metodologia de CGH, o DNA teste é marcado com um fluorocromo verde, misturado em uma razão 1:1 com DNA normal marcado com um fluorocromo vermelho, e ambos são hibridados em preparações metafásicas humanas normais. O DNA normal e as metáfases são obtidos de um voluntário saudável ou adquiridos comercialmente. Os fragmentos de DNA marcados em verde e vermelho competem pela hibridação em seus locos de origem na preparação metafásica. A proporção de fluorescência verde e vermelha medida ao longo do eixo cromossômico representa perda (razão  $< 1$ ) ou ganho (razão  $> 1$ ) de material genético na célula da amostra em estudo, naquela região específica. Além do microscópio de fluorescência, a técnica requer um *software* para a análise dos resultados. A Hibridação Genômica Comparativa (CGH) permite um *screening* completo do genoma com o objetivo de descobrir e mapear perdas e ganhos cromossômicos (Squire e Perlukowski, 1998).

Diversas publicações utilizaram a CGH como ferramenta para detecção de alterações genéticas na endometriose. Gogusev e colaboradores (1999) examinaram 18 lesões endometrióticas obtidas de pacientes em estadio avançado, e alterações recorrentes no número de cópias de genes foram encontradas em 15 de 18 casos (83%). Perdas de material genômico nos cromossomos 1p e 22q foram detectadas em 50% dos casos. Outras perdas comuns foram observadas nos cromossomos 5p (33%), 6q (27%), 7p (22%), 9q (22%), 16 (22%), e 17q em um caso. Ganhos de seqüências de DNA foram encontrados em 1q, 6q, 7q e 17q em quatro casos. Em um trabalho subsequente, o mesmo grupo (Gogusev *et al.*, 2000) avaliou por CGH uma linhagem celular permanente derivada de endometriose (FbEM-1) e observou que ganhos cromossômicos eram mais comumente observados do que perdas, sendo que um aumento significativo do número de cópias de seqüências de DNA foi detectado em 1q, 5p, 6p e 17q correspondendo a ampliações.

A metodologia de CGH também foi utilizada na avaliação de alterações genéticas em casos de carcinomas de ovário com origem na endometriose (Mhaweck *et al.*, 2002). Foram observadas alterações cromossômicas em três casos de carcinoma de ovário sendo ganhos em 1q, 8q e 13q e perda em 10p. No entanto, nenhuma alteração cromossômica foi detectada no tecido endometriótico de nenhum dos três. Os autores concluíram que essas regiões alteradas podem conter genes supressores tumorais ou oncogenes responsáveis pela transformação maligna da endometriose.

Mais recentemente, a metodologia de *CGH-array*, que substitui os cromossômicos metafásicos por regiões de DNA genômico, começou a ser utilizada

em estudos de endometriose (Guo *et al.*, 2004) para detecção de perdas e ganhos genômicos.

Apesar de alguns trabalhos terem avaliado a endometriose em relação a possíveis alterações cromossômicas detectadas por CGH, somente um estudo comparou o tecido endometriótico ovariano e o endométrio normal das mesmas pacientes. Wu e colaboradores (2006) investigaram tecidos ectópicos e eutópicos, porém utilizando a técnica de *array-CGH*, tanto em endometrioses peritoneais quanto ovarianas.

### ***Genes Candidatos em Endometriose***

Aproximadamente 50% das lesões endometrióticas poderiam produzir alterações genéticas somáticas em regiões cromossômicas que supostamente conteriam genes envolvidos na tumorigênese ovariana, especialmente do tipo endometrióide (Jiang *et al.*, 1996). Alterações genéticas comuns foram detectadas em casos de endometriose concomitante com cânceres, apoiando o modelo de progressão da carcinogênese a partir de um precursor benigno ao tumor de ovário (Jiang *et al.*, 1998; Thomas e Campbell, 2000a; b).

Um número cada vez maior de pesquisas tem sido realizado na procura por associações entre a endometriose e alterações/polimorfismos em genes candidatos. Dentre as associações descritas estão:

- Galactose-I-fosfatase uridiltransferase (*GALT*): Localizado em 9p13, foi o primeiro gene candidato a ser associado à endometriose (Cramer *et al.*, 1996). O

polimorfismo específico descrito foi uma transição adenina-guanina, onde uma mutação no códon 314 do éxon 10 levaria a uma substituição de aspartato por asparagina. Entretanto, esta associação não foi confirmada por outros autores (Morland *et al.*, 1998; Hadfield *et al.*, 1999; Stefansson *et al.*, 2001).

- Genes de Detoxificação de Fase I (receptor Ah, *CYP1A1*, *NAT2*): Enzimas do metabolismo de drogas da fase I, que agem introduzindo um grupo funcional em seus substratos endógenos e exógenos, podem estar relacionadas à ativação de compostos pro-carcinogênicos. Aproximadamente 10% da população humana apresenta "alta" inducibilidade do *CYP1A1* como resultado do polimorfismo A2, e poderiam apresentar um maior risco para o desenvolvimento de tumor ou, por analogia, de endometriose (Bischoff e Simpson, 2004).

- Genes de Detoxificação de Fase II (*GSTs*, *NAT2*): os genes *GSTs*, *GSTM1* e *GSTT1*, cruciais para a detoxificação de produtos do estresse oxidativo, são de relevância específica já que são produzidos durante o reparo do epitélio ovariano (Sarhanis *et al.*, 1996).

- Genes relacionados a esteróides (receptor de estrógeno, gene da aromatase): A relação entre endometriose e o aumento da produção de estrógeno é uma hipótese largamente difundida e biologicamente plausível. O receptor de estrógeno (*ER*) e o gene da aromatase (*CYP19*) são prováveis genes candidatos. Eles podem tanto aumentar o acúmulo de estrógeno quanto produzir um ambiente hormonal mais rico do que o convencional (Bulun *et al.*, 2000).

- Genes de Adesão Intracelular (*ICAM-1*), matriz de metaloproteinases e fatores angiogênicos: Genes candidatos baseados em estudos imunohistoquímicos *in*

*vivo* e *in vitro* (Henriet *et al.*, 2002; Lessey, 2002; Osteen *et al.*, 2002). Moléculas de adesão celular, principalmente integrinas e caderinas, são os principais mediadores de adesão célula-célula e célula-matriz e sua expressão pode ser importante para a adesão inicial do tecido esfoliado (Beliard *et al.*, 1997).

- Citocinas: Lebovic e colaboradores (2002) relataram que o gene de ciclo celular Tob-1 estava menos expresso em amostras de endometriose (48%) quando comparado ao controle (16%), após tratamento com IL1- $\beta$ .

- Genes de reparo a DNA *mismatch*: A metilação alterada nesses genes tais como *hMLHI* foi observada em 4/46 casos de endometriose de grau III/IV (8,6%) (Martini *et al.*, 2002).

- Genes supressores tumorais: Bischoff e Simpson (2004) sugeriram como principais genes candidatos os oncogenes e genes supressores tumorais mapeados no cromossomo 17, especificamente *BRCA1* e *TP53*. Por outro lado, alguns autores concordam que a imunorreatividade da p53 não é detectável em amostras de endometriose não associadas a carcinomas (Vercellini *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1998; Okuda *et al.*, 2003). Outro gene supressor tumoral estudado em endometriose é o *PTEN*, mapeado em 10q23. Mutações no *PTEN* foram relatadas em tumores endometrióticos (Obata *et al.*, 1998) e em tumores epiteliais ovarianos relacionados à endometriose (Campbell e Thomas, 2001). Mutter e colaboradores (2000) enfatizaram que a perda da função do *PTEN* seria um evento primário na tumorigênese endometriótica. Enquanto nenhuma amostra de endométrio normal apresentou mutações no *PTEN*, uma taxa de mutação de 83% foi encontrada em



adenocarcinomas endometriais endometrióides e de 55% em lesões intraepiteliais endometriais pré-malignas.

- Oncogenes: Nezhat e colaboradores (2002) compararam padrões de coloração de bcl-2 em cistos endometrióticos benignos, tumores ovarianos e áreas de endometriose associadas aos tumores, em uma tentativa de identificar uma correlação seqüencial e etiológica. Apenas 23% dos cistos endometrióticos foram corados positivamente para bcl-2 enquanto 67% dos tumores endometrióides e 74% dos carcinomas ovarianos de células claras apresentaram resultado positivo. Das 12 amostras de endometriose de áreas adjacentes a carcinomas endometrióides e das 11 amostras de endometriose adjacentes a neoplasias de células claras, 42 e 73% respectivamente expressaram bcl-2.

Bischoff e Simpson (2004) criaram a hipótese de que duas ou mais alterações gênicas concomitantes são necessárias para o surgimento da endometriose. Diferentemente da neoplasia em si, os genes alterados na endometriose não necessariamente precisam ser oncogenes ou genes supressores tumorais. Os autores acreditam que o primeiro passo envolve um gene que aumenta a predisposição para adesão e implantação do tecido endometrial menstrual que sofreu refluxo. Esse gene pode estar envolvido com citoesqueleto (MMPs) ou adesão celular (*ICAM1*). O segundo passo deve considerar genes de crescimento endometrial como receptor de estrógeno (*ER*) ou de regulação de esteróides (*CYP19*). Eles também sugerem que em passos adicionais possa haver a participação de um oncogene, o que então levaria a uma proliferação celular descontrolada.

A endometriose realmente apresenta alguns aspectos de malignidade como crescimento e vascularização aumentados e invasão tecidual, mas características importantes do câncer como expansão monoclonal e alterações genéticas permanecem não esclarecidas. A presença de mutações gênicas deve ser investigada não apenas em casos de endometriose concomitante ao câncer de ovário ou a formas de transição histológica, mas também em cistos endometrióticos isolados. Devido à etiologia complexa e multifatorial, envolvendo herança familiar e múltiplos genes candidatos, a endometriose é considerada alvo ideal para estudos de *screening* genômico.

***Justificativa***

## JUSTIFICATIVA

A endometriose é uma doença ginecológica benigna comum que afeta em torno de 10% das mulheres em idade reprodutiva. As pacientes podem apresentar desde ausência completa de sintomas até dor pélvica, dismenorréia, dispneúria e infertilidade.

A literatura relata que 50% das pacientes com dor pélvica e infertilidade apresentam endometriose, e há 1% de risco de transformação maligna da endometriose. Devido à dificuldade de estabelecer um diagnóstico preciso, e por ser considerada um problema de saúde pública, torna-se importante identificar marcadores biológicos para triagem de mulheres com predisposição à endometriose, assim como para o diagnóstico precoce e não invasivo da doença.

Apesar de alguns trabalhos terem avaliado a endometriose em relação a possíveis alterações cromossômicas, utilizando a metodologia de CGH, nenhum desses comparou o tecido endometriótico ovariano e o endométrio normal das mesmas pacientes. Até o momento, não existem relatos na literatura de estudos de perdas e ganhos genômicos utilizando a metodologia de CGH em amostras brasileiras de endometriose ovariana.

## ***Objetivos***

## OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho é determinar o diagnóstico citogenético molecular de amostras de endometriomas ovarianos e de tecido eutópico (endométrio) das mesmas pacientes, por meio da técnica de Hibridação Genômica Comparativa.

Os objetivos intermediários são:

- (a) Detecção de perdas e/ou ganhos de regiões cromossômicas em amostras de endometriose;
- (b) Comparação entre os resultados obtidos nas lesões endometrióticas ovarianas e no tecido endometrial eutópico de pacientes com diagnóstico de endometriose;
- (c) Identificação das regiões cromossômicas preferenciais e conseqüentemente de genes que possam estar envolvidos no processo de desenvolvimento da doença.

## ***Material e Métodos***

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Casuística*

O projeto foi desenvolvido no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Laboratório de Citogenética Humana) da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e na Division of Applied Molecular Oncology do Princess Margaret Hospital, Ontario Cancer Institute, University Health Network, Toronto, Canadá, em colaboração com o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP (Serviço de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da FMRP – USP) e com o Laboratório de Oncologia Pediátrica do Departamento de Pediatria e Puericultura (FMRP-USP).

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCFMRP – USP processo nº 11736/2004.

Foram selecionadas dez mulheres, com idade variando entre 24 a 45 anos, apresentando ciclos menstruais regulares (de 25 a 35 dias de intervalo), atendidas no ambulatório de infertilidade do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP, após confirmação diagnóstica de endometriose. Os critérios de seleção foram: pacientes sem história de uso de anticoncepcionais orais nos últimos seis meses e sem referência a qualquer outra forma de tratamento hormonal.

Dentre as pacientes, sete foram encaminhadas ao serviço para laparoscopia pelo Ambulatório de Dor Pélvica e Endoscopia (AGDE) com indicação de dor pélvica e três foram encaminhadas pelo Ambulatório de Infertilidade Conjugal do HCFMRP-USP



com indicação de infertilidade. As informações clínicas de cada paciente estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição das características clínicas das pacientes participantes no estudo.

<b>PACIENTE</b>	<b>IDADE</b>	<b>GRAU</b>	<b>DIA DO CICLO</b>	<b>INDICAÇÃO</b>	<b>GRAVIDEZ</b>
O1/ON1	42	IV	11	DOR	G5P4A1
O2/ON2	31	IV	7	INFERTILIDADE	G0
O3/ON3	45	IV	5	DOR	G3P3A0
O4/ON4	24	IV	6	DOR	G0
O5/ON5	42	III	7	DOR	G2P2A0
O6/ON6	40	III	4	DOR	G2P2A0
O7/ON7	36	IV	8	DOR	G3P3A0
O8/ON8	35	III	5	INFERTILIDADE	G0
O9/ON9	35	IV	7	INFERTILIDADE	G2P0A2
O10/ON10	42	IV	8	DOR	G2P2A0

Todas as pacientes participantes da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

### ***Material***

Foram utilizadas 20 amostras teciduais de endométrio eutópico e ectópico das 10 pacientes na fase proliferativa do ciclo menstrual (1° ao 12° dia). Durante a laparoscopia, exame para diagnóstico da endometriose, foram coletadas biópsias das diferentes lesões endometrióticas, sendo 10 amostras de endometrioma ovariano e

10 amostras de endométrio eutópico das mesmas pacientes utilizando Cureta de Novak. Por se tratar de um procedimento rotineiro para diagnóstico, não acarretou desconforto adicional às pacientes.

Todos os casos foram histopatologicamente confirmados. A doença foi estadiada de acordo com a classificação da American Society for Reproductive Medicine (1997). As amostras foram armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  após tratamento com criopreservador Tissue-Teck® O.C.T. Compound (Sakura Finetek USA. Inc., Torrance, CA).

## ***Métodos***

### *Preparação das Células Metafásicas*

Amostras de sangue periférico de indivíduos normais do sexo feminino foram cultivadas durante 72 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  segundo a técnica de obtenção de células metafásicas a partir da cultura temporária de linfócitos de sangue periférico (Moorhead *et al.*, 1960) modificada por Ferrari (1968). Em resumo, a cultura de sangue periférico foi estimulada com fitohemaglutinina (Difco) por 71 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Adicionou-se colchicina 0,0016% permanecendo por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . A hipotonização foi feita com solução de KCl (0,075M) e interrompida após 20 minutos com fixador (metanol/ácido acético 3:1). O procedimento de fixação do sedimento foi repetido duas vezes, sendo que a última repetição foi realizada com fixador na proporção metanol/ácido acético 1:1. Após o gotejamento do material nas lâminas, estas foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

### *Extração de DNA de tecido endometrial*

O DNA foi isolado utilizando o reagente TRIzol LS (Invitrogen) de acordo com as normas do fornecedor, para posterior amplificação e marcação por SCOMP.

Após a retirada da fase aquosa com RNA, os tubos contendo a interfase/fase orgânica com TRIzol foram centrifugados a 12.000 RPM durante 5 minutos a 4°C. Qualquer resquício da fase aquosa foi cuidadosamente removido evitando assim a contaminação do DNA com RNA. Foram adicionados 5 mL de tampão BEB (back extraction buffer) para cada 1 mL de TRIzol utilizado para a extração de RNA em cada tubo. Durante pelo menos 3 minutos, as amostras foram homogeneizadas por inversão dos tubos. Os tubos foram centrifugados a 12.000 RPM durante 30 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa superior foi transferida para outro tubo onde foram adicionados 0,4 mL de isopropanol para cada 1 mL de TRIzol. A amostra foi misturada por inversão durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 RPM durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e 0,5 mL de etanol 70% para cada 1 mL de TRIzol utilizado na extração de RNA foi adicionado ao DNA precipitado para lavagem. A amostra foi centrifugada a 12.000 RPM durante 15 minutos a 4°C. O etanol foi removido e o DNA foi ressuspenso em 20µL de água. O DNA foi então armazenado a -80°C até sua utilização.

### *Amplificação e Marcação do DNA por SCOMP*

#### - Single Cell Comparative Genomic Hybridization -

O protocolo utilizado para marcação por SCOMP foi proposto em 2002 (Stoecklein *et al.*, 2002). Para a ligação de adaptadores, foi utilizado um total de 150 a 300 ng do DNA purificado. As reações de clivagem com a endonuclease de restrição *MseI*, ligação dos adaptadores e a primeira amplificação pela PCR foram realizadas no mesmo tubo para prevenir a perda de fragmentos genômicos.

Inicialmente, o DNA foi submetido à clivagem com 24 unidades da endonuclease de restrição *MseI* (*New England Biolabs*), em tampão universal One-phor-All buffer plus (OFA plus) (10mM de Tris-acetato pH 7,5, 10mM de acetato de magnésio, 50mM de acetato de potássio). Incubou-se a 37°C durante 3 horas e em seguida a 65°C, durante 5 minutos, para inativação da enzima.

Em um tubo separado, os adaptadores foram formados pelo pareamento dos oligonucleotídeos LIB1 (5'-AGTGGGATTCCTGCTGTCAGT-3') e ddMseI (5'-TAACTGACAGCdd-3'). O pareamento de bases dos oligonucleotídeos adaptadores foi realizado em tubo separado, submetido a um gradiente de temperatura de 65°C a 15°C com rampa de 1 min/°C. Em seguida, adicionou-se 1 µL de ATP 10mM (*Invitrogen*) e 1 µL de T4 DNA ligase (*Roche*) 5U/µL. Esta mistura foi transferida ao DNA previamente tratado com a endonuclease *MseI* e incubada a 15°C *overnight*.

Após a ligação dos adaptadores, o kit *Elongase Amplification System* (*Roche*) foi utilizado para a amplificação primária. A reação foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 2,5 mM de cada dNTP, 60 mM de Tris-SO<sub>4</sub> pH 9,1, 10 mM de

(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 1,5 mM de MgSO<sub>4</sub> e 1 unidade da enzima Expand Long Template (*Roche*). Adicionamos 40 µL desse mix aos 10 µL da reação de ligação. A amplificação foi realizada em um termociclador programável PTC-200 (MJ Research) e consistiu de: (a) 68°C por 3 minutos, (b) 15 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto e 30 segundos (com 1 segundo adicional por ciclo para a temperatura de extensão), (c) 8 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 30 segundos (com 1 segundo adicional por ciclo) e 68°C por 1 minuto e 45 segundos (com 1 segundo adicional por ciclo), (d) 22 ciclos de 94°C por 40 segundos, 65°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto e 53 segundos (com 1 segundo adicional por ciclo) e (e) 1 ciclo de 68°C por 3 minutos e 40 segundos.

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando-se o QIAquick PCR Amplification Kit (*QIAGEN*) de acordo com as instruções do fornecedor.

Para a amplificação secundária, 2 µL do produto previamente purificado foram utilizados como molde em uma segunda reação de amplificação para marcação dos fragmentos. A solução de reação foi composta por 60 mM de Tris-SO<sub>4</sub> pH 9,1, 10 mM de (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 1,5 mM de MgSO<sub>4</sub>, 2 unidades da enzima Elongase, 1,4 µM do oligonucleotídeo LIB1, 330 µM de dGTP, dATP e dCTP, 290 µM de dTTP e 40 µM de digoxigenina 11-dUTP (para o DNA de referência) ou biotina 16-dUTP (para o DNA teste).

As condições de amplificação foram de 1 ciclo de 94°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos, 68°C por 2 minutos; 10 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 68°C por 2 minutos com 20 segundos adicionais por ciclo.

O oligonucleotídeo LIB1 foi removido pelo tratamento com a enzima de restrição *TruI* (*Fermentas*) conforme as instruções recomendadas pelo fornecedor. A enzima foi inativada a 65°C por 5 minutos.

Para a reação de precipitação, 8 µg de DNA teste (marcado com biotina 16-dUTP) foram colocados em um tubo de reação, juntamente com 8 µg de DNA de referência (marcado com digoxigenina 11-dUTP), 10 µL de Human Cot-1 DNA (1 mg/mL), 10 µL de DNA de esperma de salmão (10 µg/µL), 10 µL de acetato de sódio 3 M, 400 µL de etanol absoluto gelado. O tubo foi mantido a -20°C *overnight* ou a -70°C durante 1 hora. Centrifugou-se a 14.000 RPM, a 4°C durante 45 minutos, adicionou-se 300 µL de etanol 70%, centrifugou-se novamente e depois o material permaneceu secando à temperatura ambiente. O mesmo foi ressuscitado em 6 µL de solução 30% dextran sulfato/4xSSC durante 15 minutos a 37°C e em seguida foram adicionados 6 µL de formamida 100%. A sonda foi desnaturada por 6 minutos a 78°C e incubada a 37°C por 1 hora (pré-anelamento).

### *Hibridação Genômica Comparativa*

Metáfases normais do sexo feminino foram tratadas em uma solução 10% pepsina/0,01M HCl a 37°C durante 2 minutos para eliminação do citoplasma. Em seguida, as lâminas foram incubadas em PBS/MgCl<sub>2</sub> durante 5 minutos em temperatura ambiente, desidratadas em uma série de etanóis (70%, 90% e 100% por 2 minutos cada) e deixadas à temperatura ambiente para secagem. As lâminas foram então incubadas em solução 2xSSC a 72°C durante 30 minutos e depois em uma nova solução 2xSSC a temperatura ambiente durante 5 minutos e em solução

0,1xSSC a temperatura ambiente durante 1 minuto. Em seguida ocorreu a desnaturação das lâminas em solução NaOH à temperatura ambiente durante 45 segundos e a incubação seqüencial das lâminas em 0,1xSSC a 4°C durante 1 minuto e em 2xSSC a 4°C durante 1 minuto. As preparações foram então desidratadas em uma série de etanóis (70%, 90% e 100% por 2 minutos cada). Quando as lâminas estavam completamente secas, a sonda foi aplicada às lâminas e coberta com lamínula, que foi selada com *rubber cement*. A hibridação ocorreu em câmara úmida a 37°C durante 72 horas.

Após a hibridação, as lâminas foram lavadas seqüencialmente em 50% formamida / 2xSSC pH 7,0, a 45°C durante 5 minutos por 3 vezes; 0,1% SDS / 0,1xSSC a 45°C durante 5 minutos por 3 vezes e 2xSSC a 45°C durante 5 minutos por 3 vezes. Em seguida, uma solução de 20 µL de tampão TNB (0,1 M TRIS pH 7,5/0,15 M NaCl/0,5% *blocking* reagente – Roche) e 20 µL de tampão block I (3% BSA e 4xSSC pH 7,0/0,1% Tween 20) foi aplicada às lâminas e estas foram cobertas com lamínula e incubadas a 37°C em câmara úmida durante 45 minutos. Após este procedimento, as lamínulas foram retiradas e foi aplicada uma solução de 10 µL de tampão block I, 10 µL de tampão TNB, 5 µL de anti-digoxigenina-rodamina e 8 µL de FITC-avidina. As lâminas foram cobertas com lamínulas e incubadas a 37°C em câmara úmida durante 30 minutos. Finalizando, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram lavadas em solução 4xSSC/0,1% Tween 20 a 45°C durante 5 minutos por 3 vezes e contracoradas com 20 µL de DAPI (VECTOR, CA) para a coloração dos cromossomos e núcleos.

### *Análise de Imagens*

Esta técnica utiliza uma estratégia de hibridação no qual o material genético a ser investigado, geralmente o DNA da amostra, é usado como uma sonda. Este DNA é marcado com uma cor (por exemplo, verde, FITC), e uma quantidade igual de DNA normal é marcada com uma cor diferente (como o corante vermelho rodamina). As duas sondas de DNA são hibridadas simultaneamente a uma preparação metafásica de cromossomos normais. Quando a amostra contém cromossomos normais, ambas as sondas estarão presentes em quantidades iguais, e os dois corantes se combinarão para produzir uma terceira cor, ou serão canceladas uma pela outra, e removidas pelo computador. Quando a amostra contém um excesso de material cromossômico, como cromossomos ou regiões cromossômicas adicionais, ou ampliações de genes, a cor será verde. Regiões genômicas deletadas na amostra resultarão no excesso de sonda de DNA normal, produzindo um sinal vermelho. A taxa de intensidade de cada fluorocromo é medida através do uso de um sistema de análise de imagens digital, associado a um software apropriado (Blancato, 1999).

As preparações metafásicas foram examinadas em microscópio de epifluorescência Axioskop 2 Plus (Zeiss), capturadas e analisadas pelo programa de CGH Isis FISH Imaging System V 5.0 (Metasystem GmbH, Althusheim, Germany). Para cada hibridação, de 20 a 30 imagens foram capturadas, 10 das quais foram utilizadas para análise. O *software* permite a comparação da quantidade de DNA teste (verde) com a quantidade de DNA controle (vermelho) hibridados ao longo da extensão de cada cromossomo e determina a razão média de fluorescência vermelho/verde para cada cromossomo. Em regiões onde o número de cópias de seqüências de DNA teste e referência é idêntico, espera-se que a razão de



fluorescência seja 1,0; quando o número relativo de cópias de seqüências de DNA é maior no teste, a razão é maior do que 1,0; e quando o número relativo de cópias de seqüências de DNA é menor no teste, a razão é menor do que 1,0. Desvios da razão abaixo ou acima dos limites de 0,8-1,25 são classificados como representações significantes de sub- ou sobre-representação do número de cópias das seqüências de DNA na amostra teste.

Como controle interno, testes de hibridação utilizando DNA normal masculino (verde) *versus* feminino (vermelho) e depois, DNA normal masculino (vermelho) *versus* feminino (verde) foram utilizados para confirmar a eficiência da hibridação. Todos os cariótipos foram analisados por mais de um observador para garantir a confiabilidade do teste.

#### *Análise por Bioinformática*

As listas de genes reconhecidos nas regiões de interesse foram obtidas nos bancos de dados *Ensembl* (Sanger Institute, [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/index.html](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html)). Após a obtenção dessas listas de genes, a ferramenta FatiGO Plus (FatiGO+), do utilitário on-line Babelomics (Al-Shahrour *et al.*, 2006), foi utilizada para estratificar todos os locos existentes nas regiões de interesse, de acordo com suas propriedades biológicas, bioquímicas e funcionais. A ferramenta on-line PDQ-Wizard v.0.1 (Grimes *et al.*, 2006) foi utilizada para cruzar a lista dos genes com palavras-chave de interesse.

## ***Resultados***

## RESULTADOS

Vinte amostras de tecido endometrial foram analisadas pela metodologia de CGH. A Figura 1 representa o padrão de hibridação obtido. Estas amostras foram divididas em dois grupos, sendo dez amostras de tecido endometrial eutópico no primeiro grupo e dez de tecido endometrial ectópico ovariano no segundo grupo.

A análise do software Metasystem apontou alterações cromossômicas em ambos os grupos analisados (Tabela 2). No grupo eutópico, 6/10 amostras apresentaram alterações e no grupo ectópico foram encontradas alterações em 7/10 casos. As alterações observadas no grupo eutópico foram perda em 9q (dois casos) e ganhos em 1p (dois casos), 1q (três casos), 2q, (um caso), 9q (dois casos), 11q (dois casos), 12q (um caso), 13p, (um caso), 14p (dois casos), 14q (um caso), 15p (um caso), 16q (um caso), 17p (dois casos), 17q (dois casos), 19p (quatro casos), 19q (três casos), 20q (um caso), 21p (um caso), 21q (um caso) e 22q (três casos). O grupo ectópico apresentou perdas em 8p (um caso), 9p (um caso), 9q (três casos), 15q (um caso) e ganhos em 1p (um caso), 1q (três casos), 11q (dois casos), 13p, (um caso), 14p (um caso), 15p (um caso), 16q (três casos), 17p (três casos), 18p (um caso), 19p (três casos), 19q (dois casos), 20q (um caso), 21p (um caso), 22q (um caso) e Xq (um caso).

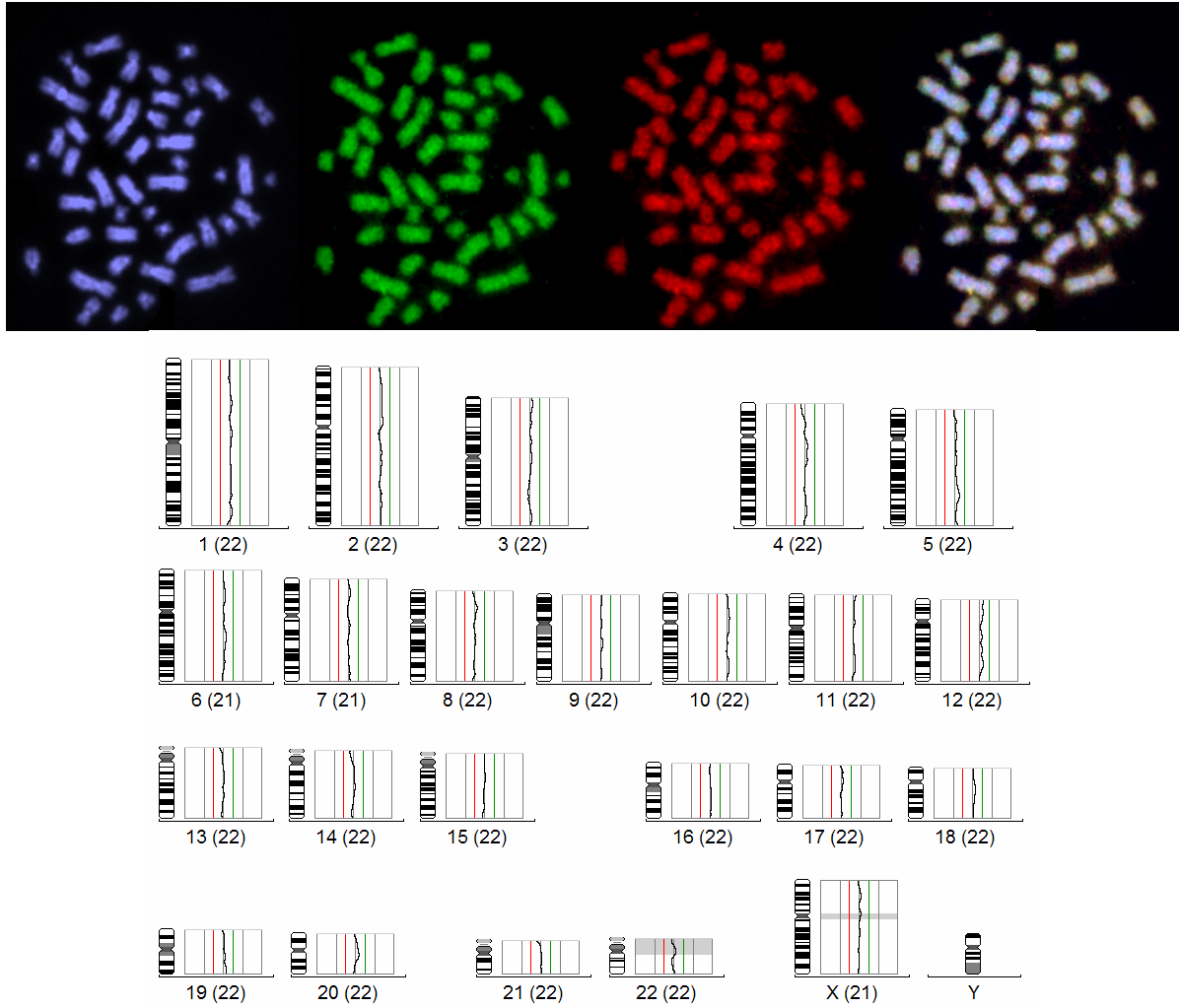


Figura 1: Padrão de hibridação obtido pela técnica de CGH. No alto, da esquerda para a direita, metáfase observada ao microscópio de epifluorescência Axioskop 2 Plus (Zeiss), no filtro para DAPI, FITC, Rodamina e a sobreposição de cores. Abaixo, perfil obtido após a captura das metáfases do caso ON1.

Tabela 2: Alterações cromossômicas detectadas por CGH nos dois grupos: dez amostras de tecido endometrial ectópico e 10 amostras de tecido endometrial eutópico.

<i><b>ECTÓPICO</b></i>		<i><b>EUTÓPICO</b></i>	
<b>O1</b>	-9q	<b>ON1</b>	sem alterações
<b>O2</b>	-9q	<b>ON2</b>	-9q
<b>O3</b>	-9q	<b>ON3</b>	-9q, +19p, +22q
<b>O4</b>	+1q, -8p, +11q, +13p, +14p, +15p, -15q, +16q, +17p, +19p, +19q, +21p, +Xq	<b>ON4</b>	+1q, +13p, +14p, +15p, +16q, +17p, +19p, +19q, +21p
<b>O5</b>	sem alterações	<b>ON5</b>	+1q
<b>O6</b>	sem alterações	<b>ON6</b>	sem alterações
<b>O7</b>	+1p, +1q, -9p, +11q, +16q, +17p, +18p, +19p, +19q, +20q, +22q	<b>ON7</b>	+1p, +2q, +9q, +11q, +12q, +14q, +17q, +19p, +19q, +21q, +22q
<b>O8</b>	sem alterações	<b>ON8</b>	sem alterações
<b>O9</b>	+17p	<b>ON9</b>	sem alterações
<b>O10</b>	+1q, +16q, +19p	<b>ON10</b>	+1p, +1q, +9q, +11q, +14p, +17p, +17q, +19p, +19q, +20q, +22q

(-) = perda; (+) = ganho; vermelho = perda; verde = ganho.

O = tecido de endometriose ovariana; ON = tecido de endométrio normal das mesmas pacientes com endometriose ovariana.

Quando as amostras foram separadas por paciente, foram formados 10 grupos, cada um contendo uma amostra de tecido eutópico e ectópico de uma mesma paciente. Duas pacientes (O6/ON6 e O8/ON8) não apresentaram nenhuma alteração em ambos

os tecidos. Duas pacientes (O1/ON1 e O9/ON9) apresentaram alteração apenas no tecido ectópico, sendo perda em 9q na paciente O1 e ganho em 17p na paciente O9. Uma paciente (O5/ON5) apresentou alteração apenas no tecido eutópico, sendo um ganho em 1q. Foram observadas alterações cromossômicas em ambos os tecidos em cinco pacientes (O2/ON2, O3/ON3, O4/ON4, O7/ON7 e O10/ON10). A paciente O2/ON2 apresentou a mesma alteração (perda em 9q) tanto no tecido eutópico quanto no ectópico. A paciente O3/ON3 mostrou perda em 9q como alteração comum nos dois tecidos, entretanto, ganhos em 19p e 22q foram encontrados apenas no tecido eutópico. Na paciente O4/ON4, todas as alterações encontradas no tecido eutópico (ganho de 1q, 13p, 14p, 15p, 16q, 17p, 19p, 19q e 21p) também foram encontradas no ectópico, no qual também se observou perda de 8p e 15q, e ganho de 11q e de Xq. A paciente O7/ON7 apresentou ganhos em 1p, 11q, 19p, 19q e 22q nos dois tecidos, mas foram encontrados ganhos em 2q, 9q, 12q, 14q, 17q e 21q apenas no tecido eutópico e ganhos em 1q, 16q, 17p, 18p e 20q, bem como perdas em 9p apenas no tecido ectópico. Por fim, a paciente O10/ON10 apresentou ganho de 1q e 19p em ambos os tecidos, porém, ganho em 16q foi encontrado no tecido ectópico e ganhos em 1p, 9q, 11q, 14p, 17p, 17q, 19q, 20q e 22q foram encontrados apenas no tecido eutópico.

As Figuras 2 e 3 ilustram as alterações encontradas somando-se todas as lesões ectópicas e eutópicas, respectivamente. Os cromossomos 3, 4, 5, 6, 7 e 10 não apresentaram quaisquer alterações. As Figuras 4 a 20 representam as alterações cromossômicas para o tecido eutópico e ectópico em cada um dos 10 pares de amostras. As regiões cromossômicas 1p33-pter, 11q12-q13.1, 17p11.1-p12, 17q25-qter, 19, 20q11.23-qter e 22q11.2-qter apresentaram alterações significativas, que estão descritas nas Figuras 4, 8, 14, 16, 17 e 19.

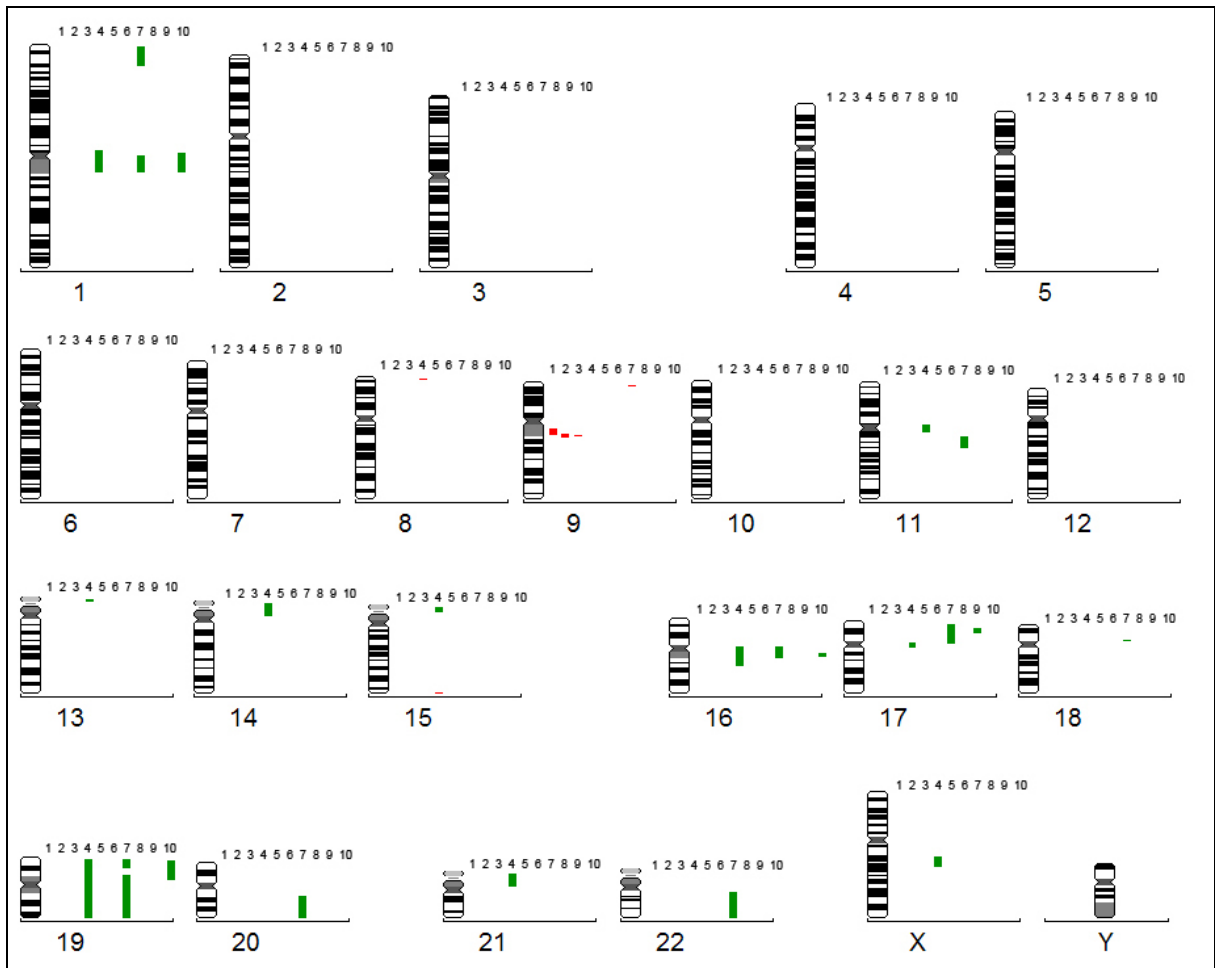


Figura 2: Alterações cromossômicas detectadas por CGH no grupo de 10 amostras de tecido ectópico. Perdas em vermelho e ganhos em verde.

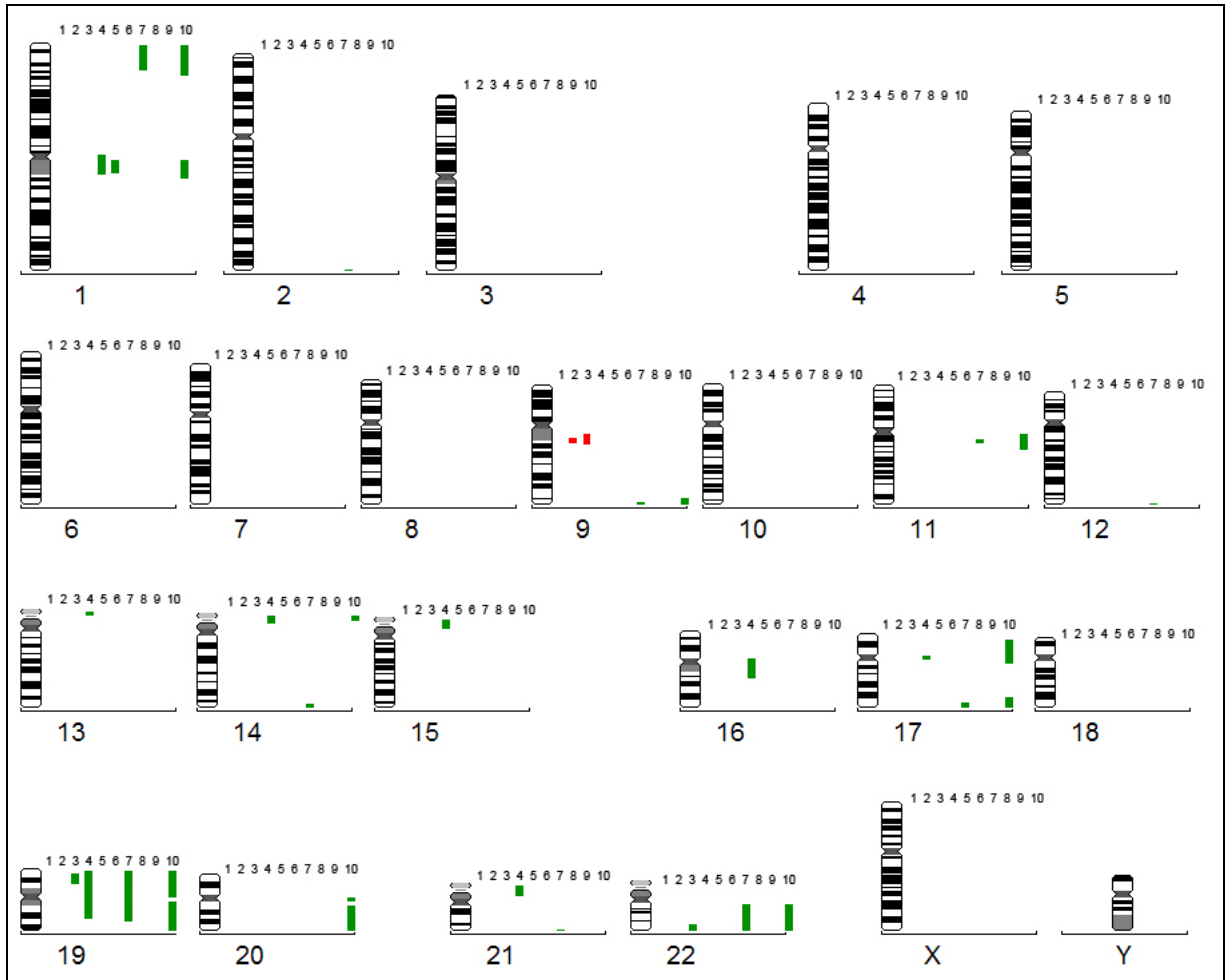


Figura 3: Alterações cromossômicas detectadas por CGH no grupo de 10 amostras de tecido eutópico das pacientes com endometriose. Perdas em vermelho e ganhos em verde.



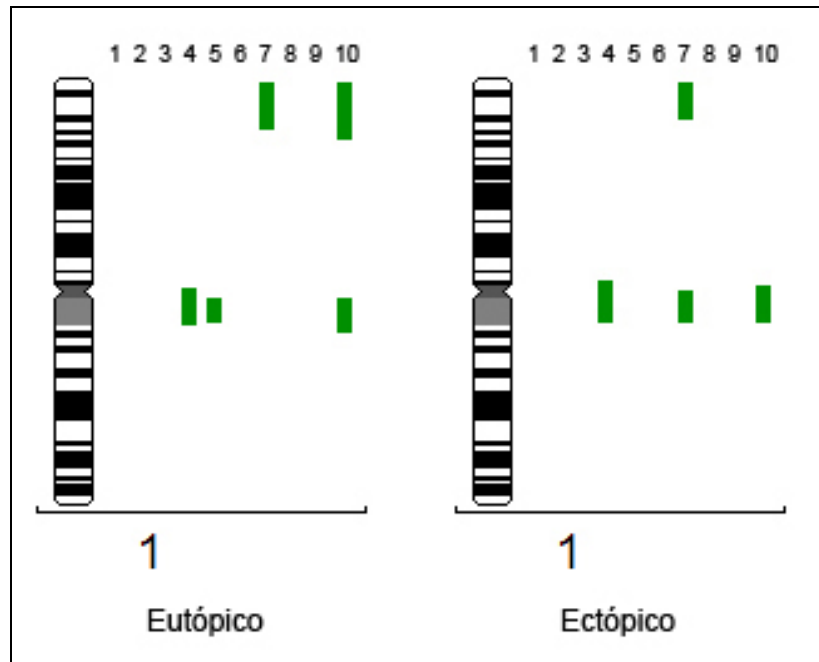


Figura 4: Alterações detectadas por CGH no cromossomo 1 no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. As barras verdes representam ganho.

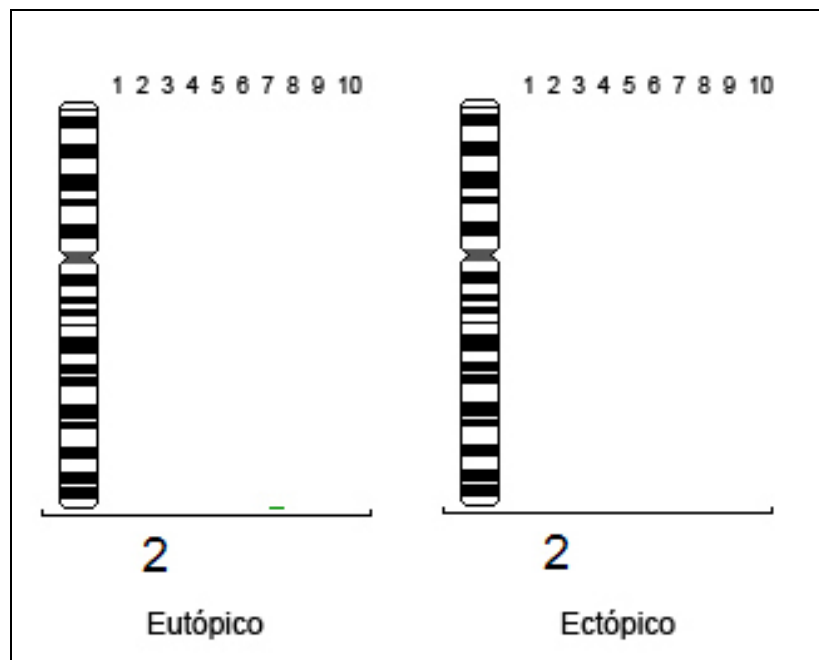


Figura 5: Alterações detectadas por CGH no cromossomo 2 no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. A barra verde representa ganho.

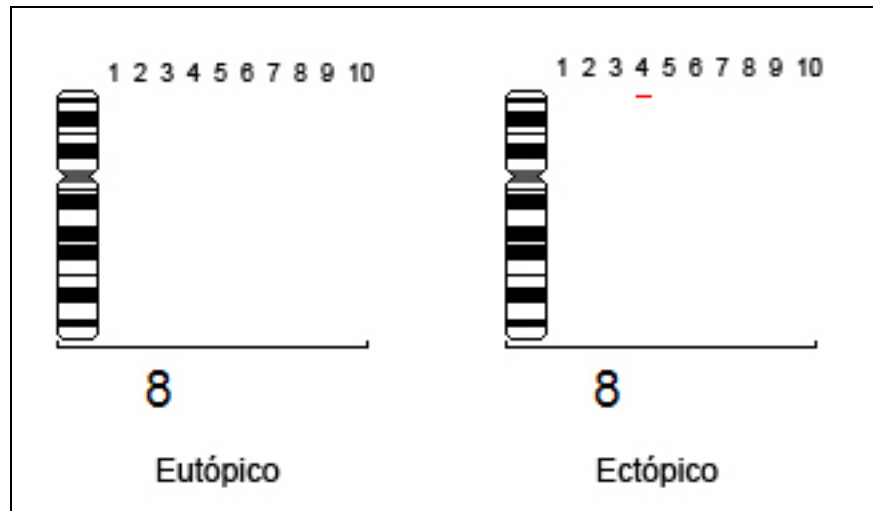


Figura 6: Alterações detectadas por CGH no cromossomo 8 no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. A barra vermelha representa perda.

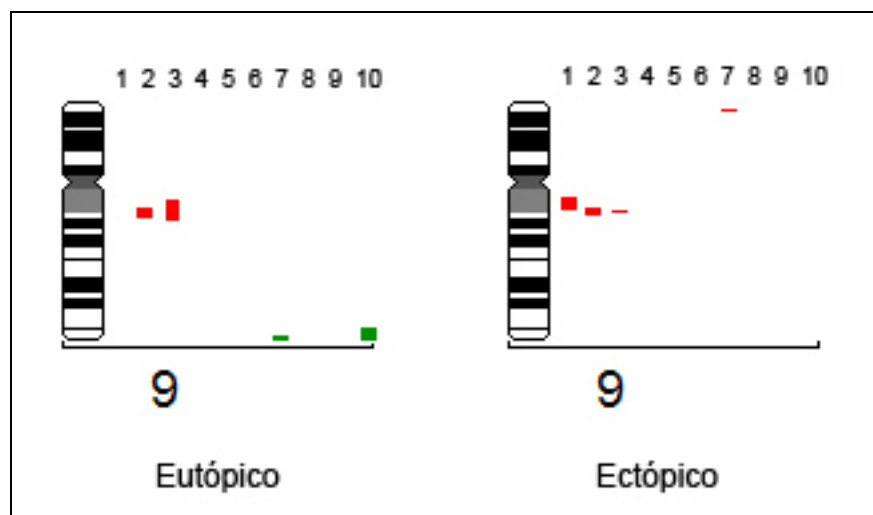


Figura 7: Alterações detectadas por CGH no cromossomo 9 no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. As barras vermelhas representam perda e as verdes representam ganho.

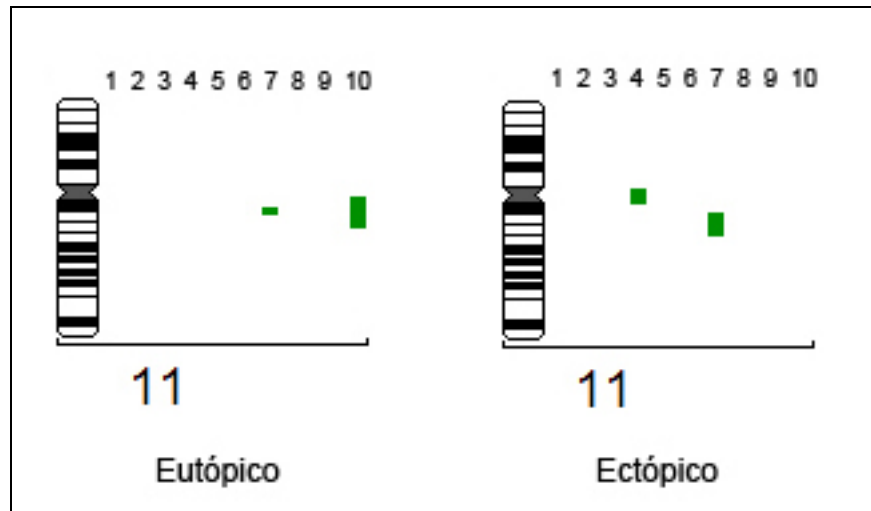


Figura 8: Alterações detectadas por CGH no cromossomo 11 no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. As barras verdes representam ganho.

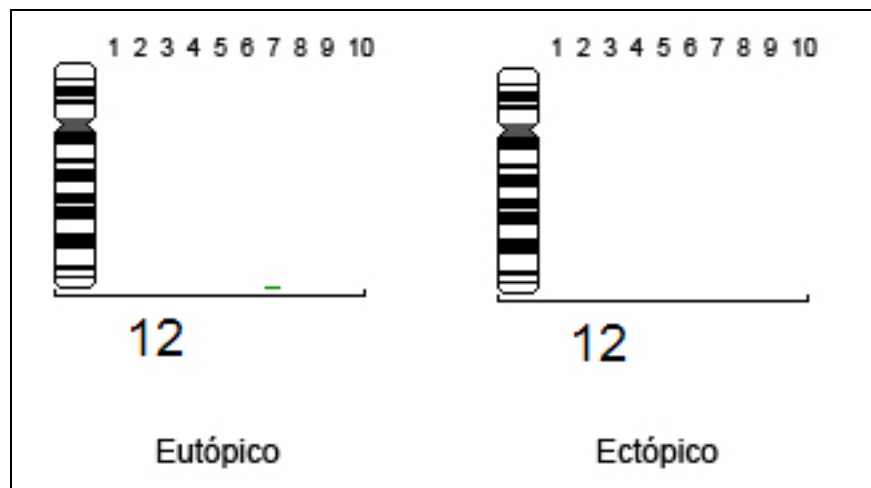


Figura 9: Alterações detectadas por CGH no cromossomo 12 no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. A barra verde representa ganho.

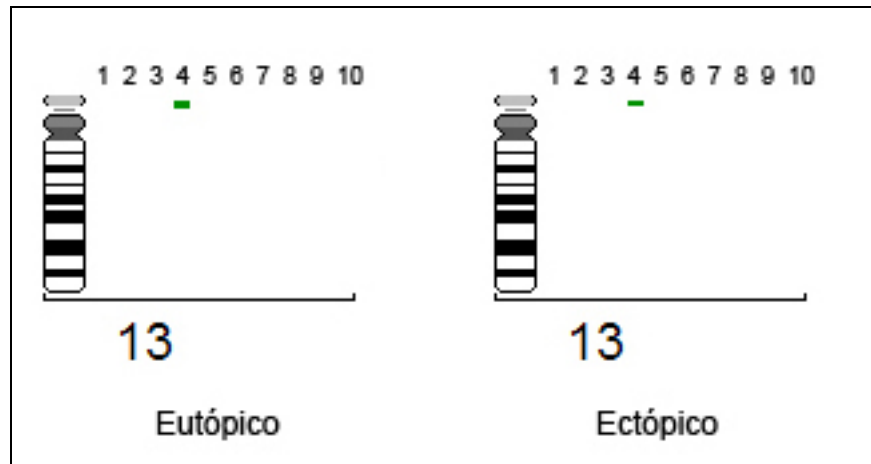


Figura 10: Alterações detectadas por CGH no cromossomo 13 no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. As barras verdes representam ganho.

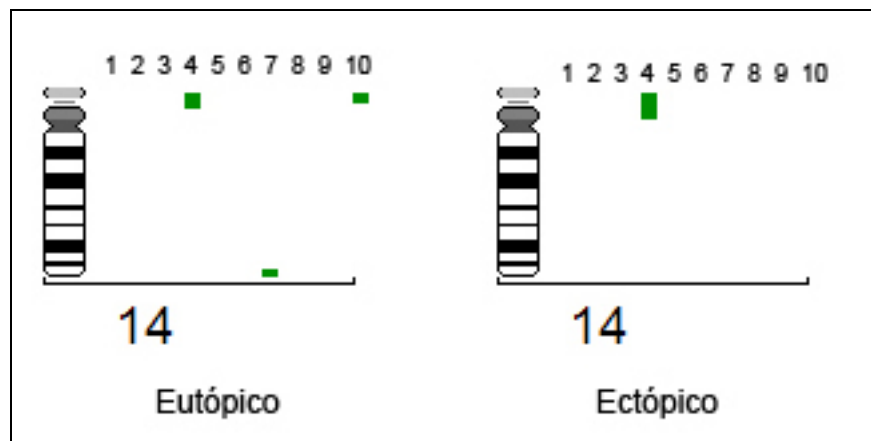


Figura 11: Alterações detectadas por CGH no cromossomo 14 no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. As barras verdes representam ganho.

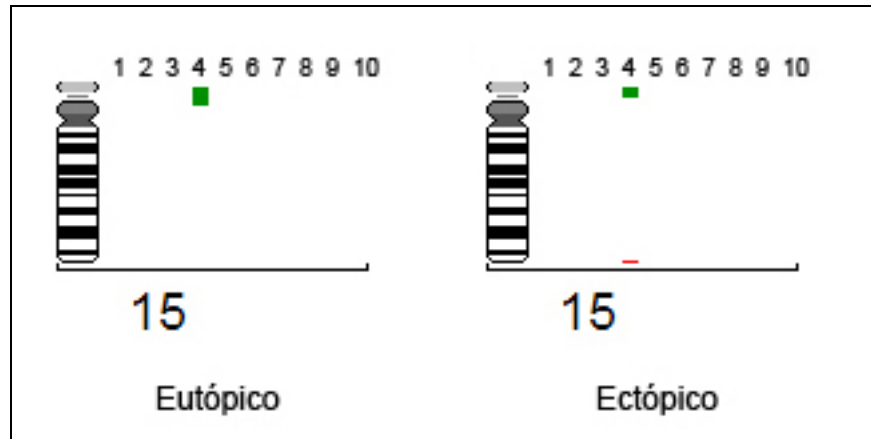


Figura 12: Alterações detectadas por CGH no cromossomo 15 no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. As barras verdes representam ganho e a vermelha representa perda.

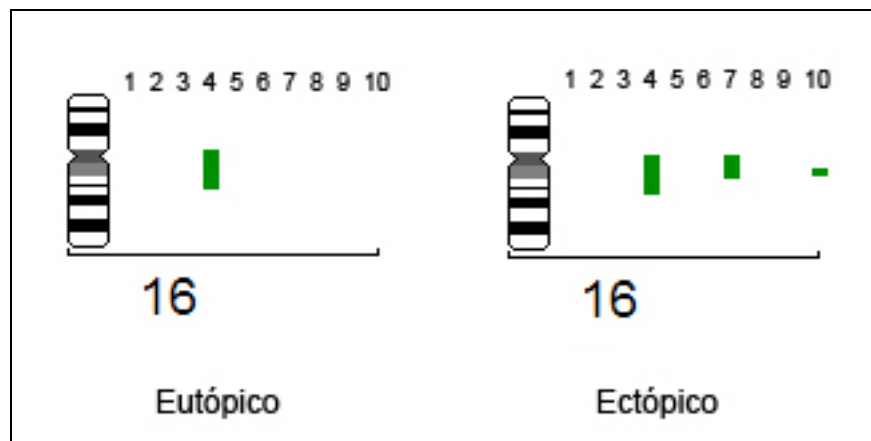


Figura 13: Alterações detectadas por CGH no cromossomo 16 no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. As barras verdes representam ganho.

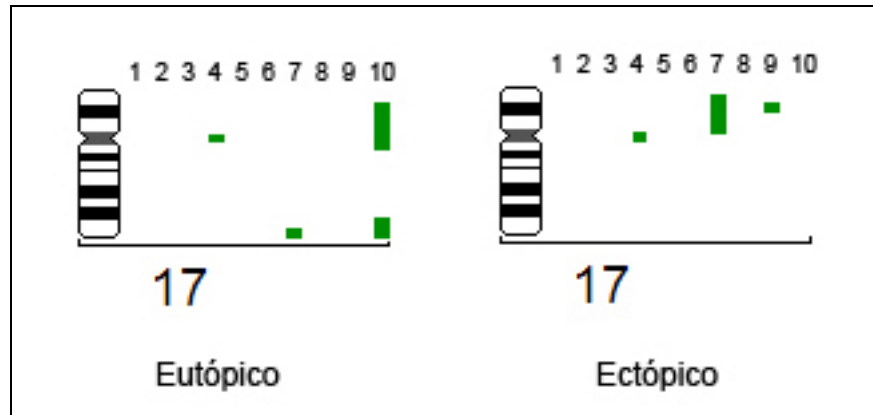


Figura 14: Alterações detectadas por CGH no cromossomo 17 no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. As barras verdes representam ganho.



Figura 15: Alterações detectadas por CGH no cromossomo 18 no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. A barra verde representa ganho.

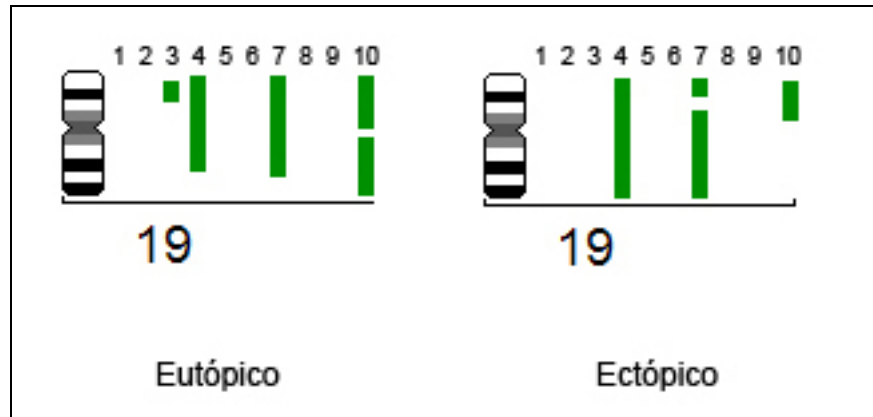


Figura 16: Alterações detectadas por CGH no cromossomo 19 no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. As barras verdes representam ganho.



Figura 17: Alterações detectadas por CGH no cromossomo 20 no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. As barras verdes representam ganho.



Figura 18: Alterações detectadas por CGH no cromossomo 21 no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. As barras verdes representam ganho.

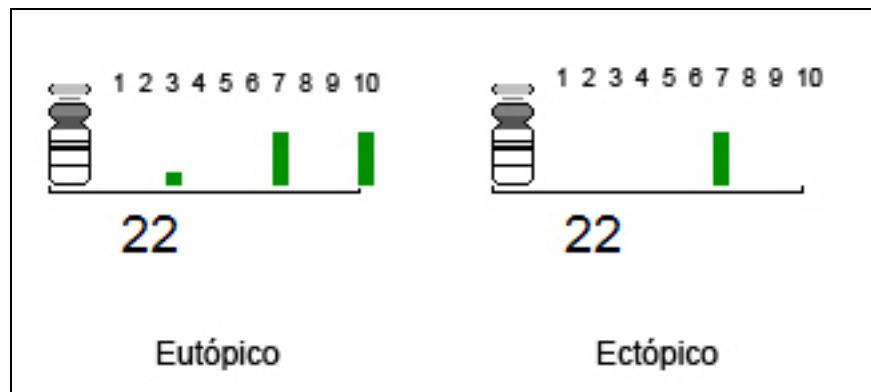


Figura 19: Alterações detectadas por CGH no cromossomo 22 no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. As barras verdes representam ganho.



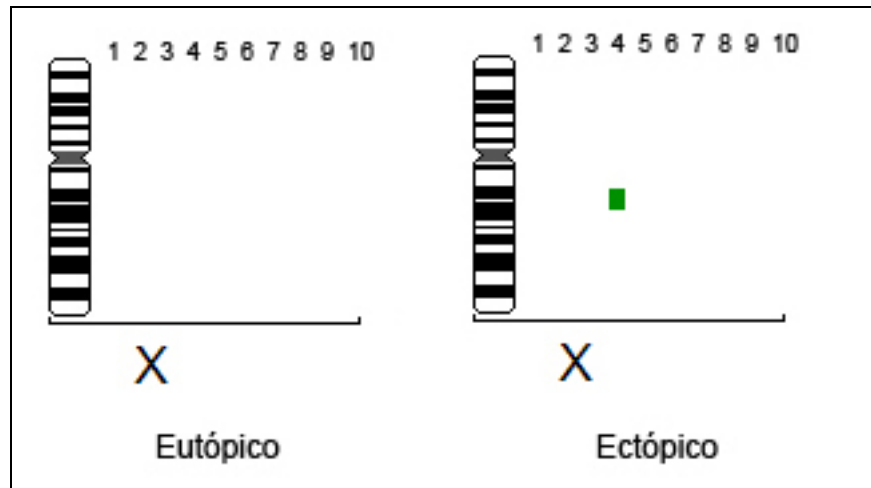


Figura 20: Alterações detectadas por CGH no cromossomo X no grupo de 10 amostras de tecido eutópico e ectópico das pacientes com endometriose. As barras verdes representam ganho.

As alterações cromossômicas significativas envolveram os cromossomos 1p, 11q, 17p, 17q, 19, 20q e 22q. Devido ao fato de algumas alterações terem sido previamente detectadas em tecidos normais em 1p, 19 e 22, regiões ricas em G-C, já descritas na literatura como resultados falso-positivos por CGH (Mhaweck *et al.*, 2002), essas regiões foram excluídas para futuras investigações. As regiões 11q, 17p e 17q não envolvem regiões de seqüências repetitivas e apresentaram alterações em mais de uma amostra, sendo, portanto selecionadas como regiões cromossômicas preferenciais para futura identificação de genes envolvidos no processo de desenvolvimento da doença.

As listas dos genes reconhecidos nessas regiões de interesse (regiões pré-selecionadas a partir dos ensaios de CGH) foram obtidas nos bancos de dados *Ensembl* (Sanger Institute, [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/index.html](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html)), especificando-se os intervalos de banda G de interesse. Foram obtidas listas de genes, exportadas em formato textual, das regiões: 11q12.3-q13.1, 17p11.1-p12 e 17q25.3-qter. As listas foram utilizadas para triagens de genes com funções relevantes que poderiam de alguma forma influenciar a ocorrência ou comportamento das lesões endometrióticas. Após a obtenção das listas de genes, a ferramenta FatiGO Plus (FatiGO+), do utilitário *on-line* Babelomics (Al-Shahrour *et al.*, 2006), foi utilizada para estratificar todos os locos existentes nas regiões de interesse, de acordo com suas propriedades biológicas, bioquímicas e funcionais. A ferramenta *on-line* PDQ-Wizard v.0.1 (Grimes *et al.*, 2006) foi utilizada para cruzar a lista dos genes com palavras-chave de interesse, obtendo-se o número total e a identificação de cada publicação pré-existente envolvendo um determinado gene e termos como "endometriose", "endométrio" ou "carcinoma de ovário". A sobreposição das duas ferramentas (FatiGo+ e PDQ Wizard) possibilitou a seleção de vários genes relevantes nas regiões de interesse, entre eles, os genes *VEGFB*, *BIRC5* e *TNFRSF13B*.

***Discussão***

## DISCUSSÃO

A endometriose é uma doença ginecológica benigna agressiva, caracterizada pela presença de tecido endometrial ectópico (Yang *et al.*, 2004). Embora muitas mulheres possam apresentar focos da doença, mesmo assintomáticas (Nap *et al.*, 2004), ela é caracterizada por sintomas como dismenorréia, dispaneuria, dor pélvica e infertilidade (Poliness *et al.*, 2004). Acredita-se que cerca de 10% da população feminina total seja afetada (Dabrosin *et al.*, 2002) e que 50% das pacientes com infertilidade e dor pélvica tenham endometriose (Cornillie *et al.*, 1990).

A literatura relata que de 25% a 50% das mulheres inférteis apresentam endometriose, e que de 30% a 50% das mulheres com endometriose são inférteis (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2004). No entanto, várias questões fisiopatológicas e terapêuticas a respeito da associação entre endometriose e infertilidade permanecem não esclarecidas.

Até o momento, a etiologia da doença permanece desconhecida. A endometriose na cicatriz após a cirurgia cesariana representa a única localização de implantes endometrióticos cuja etiologia é conhecida. Acredita-se que durante o procedimento cirúrgico, quando a cavidade uterina está aberta, haja um alto risco de decidualização da implantação do endométrio (Tarkowski *et al.*, 2001).

Várias teorias têm sido propostas para explicar a etiologia da endometriose, sendo as três principais a) implantação e crescimento de tecido endometrial em locais ectópicos após o refluxo menstrual retrógrado; b) desenvolvimento de metaplasia; c) desenvolvimento a partir de remanescentes Müllerianos. Dados epidemiológicos, cirúrgicos e patológicos questionam se as lesões peritoneais,

ovarianas e do septo retovaginal apresentam uma etiologia comum única ou se representam três entidades com etiologia e patogênese distintas (Vigano *et al.*, 2004). Embora a teoria do fluxo retrógrado seja a mais aceita, diversos autores sugerem uma origem diferente para cada um dos três tipos de endometriose (Nisolle e Donnez, 1997; Giudice e Kao, 2004; Vigano *et al.*, 2004).

Diversos fatores de risco já foram descritos para endometriose, entre eles, ciclos menstruais curtos, longa duração do fluxo menstrual, nuliparidade ou menarca precoce bem como história familiar da doença em parentes de primeiro grau. No entanto, as causas genéticas da endometriose ainda são desconhecidas, e pouca informação existe acerca de riscos constitutivos individuais, tais como hereditariedade e alterações genéticas somáticas que poderiam predispor à doença. Discute-se que a endometriose possua um componente genético, e que alterações cromossomo-específicas adquiridas possam estar envolvidas em sua patogênese.

Dada essa origem genética desconhecida, estudos que promovam um *screening* completo das alterações genômicas presentes em amostras de tecido endometriótico, bem como de tecido normal de pacientes com endometriose, podem ser informativos na busca por um possível marcador genético para a doença, além de contribuir para a definição de sua origem. Dessa forma, optamos pela metodologia de CGH, que permite um *screening* total para perdas e ganhos genômicos de uma amostra determinada.

Neste estudo avaliamos 20 amostras, sendo 10 de endometriose ovariana (tecido ectópico) e 10 de tecido endometrial normal (tecido eutópico) das mesmas pacientes. Diversas alterações envolvendo principalmente ganhos de regiões

cromossômicas foram observadas em ambos os tecidos, após análise citogenética molecular por CGH.

A literatura é bastante controversa em relação aos aspectos genéticos da endometriose e poucos estudos, utilizando a metodologia de CGH, foram realizados. Utilizando a técnica de CGH, existem relatos da total ausência de alterações cromossômicas em todas as amostras de endometriose analisadas (Mhaweck *et al.*, 2002), bem como a detecção de perdas e ganhos de regiões cromossômicas em 15/18 amostras (83%), sendo principalmente perdas em 1p32-36, 5p, 6q, 7p14-p22ter e 22q12.3-qter e ganhos em 6q e 17q (Gogusev *et al.*, 1999). Em nosso estudo, encontramos alterações em 7/10 amostras (70%) de endometriomas ovarianos, e diferentemente dos outros autores, observamos principalmente ganhos em 1p, 1q, 11q, 13p, 14p, 15p, 16q, 17p, 18p, 19p, 19q, 20q, 21p, 22q e Xq e perdas em 8p, 9p, 9q e 15q (Figura 2).

Essa discrepância de resultados pode ser explicada pela diferença no número amostral utilizado e pela heterogeneidade da origem da amostra. Mhaweck e colaboradores (2002) avaliaram tecido endometriótico de pacientes com carcinomas de ovário provenientes da endometriose e, apesar do quadro clínico agressivo, nenhuma alteração cromossômica foi encontrada no tecido endometriótico. Isto sugere que não há uma associação estabelecida entre alterações genômicas e pior prognóstico, embora o estudo tenha sido realizado com apenas três pacientes. Nossa análise também não encontrou nenhuma correlação entre a presença ou ausência de alterações cromossômicas e um mau prognóstico, de acordo com os dados do seguimento clínico dessas pacientes. O fato das pacientes O4/ON4, O7/ON7 e

O10/ON10 apresentarem mais alterações cromossômicas que as outras não foi relacionado com nenhuma complicação ou agravante da sintomatologia clínica. Nenhuma das pacientes evoluiu para quadro de tumor de ovário após seguimento clínico de três anos. Não foi observada nenhuma diferença clínica, tanto nas pacientes com perfil cromossômico normal, quanto naquelas que apresentaram várias alterações.

O outro estudo (Gogusev *et al.*, 1999) analisou tecido endometriótico de origens diferentes, sendo 6 implantes peritoneais, 2 nódulos endometrióticos umbilicais e 10 endometriomas ovarianos. Nosso estudo incluiu apenas tecido endometriótico ovariano, visando diminuir a heterogeneidade amostral, já que a endometriose nas diferentes localizações pode apresentar alterações genéticas distintas entre si, bem como diferentes origens.

A investigação do tecido endometrial eutópico de mulheres com endometriose é outra questão bastante interessante. Um estudo utilizando a técnica de CGH *array* mostrou que todas as cinco amostras estudadas apresentaram diversas alterações em vários cromossomos, sendo 1p, 3p e 4p as regiões mais comumente envolvidas em alterações genômicas (Guo *et al.*, 2004). Além disso, houve uma heterogeneidade considerável nas alterações entre as pacientes, já que nenhuma alteração foi comum entre elas, provavelmente um resultado da heterogeneidade em relação à idade do surgimento da doença, estadió e outros fatores desconhecidos.

Em nosso estudo, dentre as 10 amostras de tecido endometrial eutópico das pacientes com endometriose, seis apresentaram alguma alteração cromossômica, envolvendo perda em 9q e ganhos em 1p, 1q, 2q, 9q, 11q, 12q, 13p, 14p, 14q, 15p,

16q, 17p, 17q, 19p, 19q, 20q, 21p, 21q e 22q (Figura 3). Estes resultados confirmam que o endométrio histologicamente normal de mulheres com endometriose apresenta alterações genômicas, como previamente descrito na literatura (Giudice e Kao, 2004). A presença de alterações nas amostras de tecido eutópico de mulheres afetadas confirma a predisposição desse endométrio ao desenvolvimento da doença, podendo ser consideradas como alterações primárias para a doença.

Além disso, observamos que na maioria dos nossos casos, as alterações encontradas no tecido eutópico não foram as mesmas observadas no tecido ectópico, com exceção do caso O2/ON2 onde a alteração no tecido eutópico foi a mesma no ectópico (perda de 9q). Em um caso (O4/ON4), todas as alterações encontradas no tecido normal foram observadas também no tecido endometriótico, porém este apresentou algumas outras além das que foram encontradas no tecido eutópico. Em outros três casos (O3/ON3, O7/ON7 e O10/ON10), ambos os tecidos compartilharam apenas algumas das alterações. Esta aparente falta de homogeneidade poderia ser devido à possibilidade de múltiplas vias que levam à endometriose. A observação de alterações diferentes nos dois tecidos da mesma paciente coloca em dúvida a aplicabilidade da teoria de Sampson em nossas amostras. Pela teoria do fluxo reverso, supõe-se que as mesmas alterações encontradas no endométrio normal fossem encontradas no tecido endometriótico e que este pudesse apresentar alterações extras que seriam responsáveis por características favoráveis ao desenvolvimento da endometriose, como adesão, proliferação celular, controle negativo da apoptose e angiogênese, que o diferenciariam do tecido histologicamente normal.



Embora a teoria mais aceita seja a teoria da implantação de Sampson (Sampson, 1927), existem linhas de pesquisa sugerindo que a endometriose ovariana possui uma origem diferente da peritoneal. Postula-se que a origem da lesão peritoneal ocorra, de fato, por implantação de células provenientes do fluxo retrógrado, e que a lesão ovariana origina-se por metaplasia do tecido ovariano, isto é, indiferenciação e rediferenciação da célula ovariana, com mudança de características adquirindo um fenótipo endometrial (Nisolle e Donnez, 1997). Ou seja, a lesão seria originada de células ovarianas alteradas, e não do endométrio.

Um dos argumentos que sustentam essa teoria é a presença de endometriomas em pacientes com a síndrome de Rokitansky-Küster-Hauser, que não possuem útero e, portanto, não sofrem menstruação retrógrada (Rosenfeld e Lecher, 1981). Dessa forma, nossos resultados evidenciando alterações cromossômicas diferentes entre os tecidos ectópico e eutópico podem corroborar com os dados da literatura, que sugerem origens diferentes para as lesões peritoneais e ovarianas. O fato não exclui a possibilidade das pacientes que apresentaram um tecido endometrial geneticamente alterado, apresentarem uma maior predisposição para desenvolvimento de endometriose peritoneal devido ao mecanismo da menstruação retrógrada.

A metaplasia do epitélio celômico é uma das três teorias que tem sido propostas para explicar a patogênese da endometriose ovariana típica, além da inversão e progressiva invaginação do córtex ovariano após o acúmulo de fragmentos menstruais derivados do sangramento de implantes endometrióticos superficiais localizados na superfície ovariana, e do envolvimento secundário de cistos ovarianos funcionais por implantes endometriais localizados na superfície

ovariana (Vigano *et al.*, 2004). A hipótese da metaplasia celômica propõe que a membrana celômica original sofre metaplasia formando glândulas e estroma endometriais típicos. Essa teoria é sustentada pela descrição de casos de endometriose nas quais não ocorre menstruação retrógrada.

As alterações cromossômicas significativas nas amostras analisadas envolveram os cromossomos 1p, 11q, 17p, 17q, 19, 20q e 22q. As regiões 1p, 19 e 22 não foram consideradas para análise, devido à alta frequência de polimorfismos e a região 20q apresentou-se alterada em somente uma amostra. Desta forma, as regiões 11q, 17p e 17q foram consideradas regiões alvo, justificando a aplicação de ferramentas de bioinformática para seu mapeamento.

Entre os inúmeros genes contidos nessas regiões de interesse, identificamos vários deles relacionados à angiogênese, regulação do ciclo celular, resposta imunitária e adesão celular. Na região 11q12.3-q13.1, encontram-se diversos genes relevantes, entre eles: *RELA* (*v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3, p65 [avian]*), que atua no desenvolvimento tecidual e como regulador negativo da apoptose; *CFL1* (*cofilin 1[non-muscle]*), que atua na diferenciação celular e na regulação negativa da apoptose; *SYVN1* (*synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin*), responsável pela regulação negativa da apoptose; *VEGFB* (*vascular endothelial growth factor B*), que atua na regulação positiva da proliferação celular e regulação do ciclo celular; *MARK2* (*MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2*), atuando na morfogênese da célula e nas cascatas de sinalização intracelular; e *HTATIP* (*HIV-1 Tat interacting protein*) responsável pela regulação do crescimento celular e pela via de sinalização do receptor de andrógeno e hormônios esteróides.

A região 17p11.1-p12 também contém genes relevantes, como *UBB* (*ubiquitin B*), responsável pela morfogênese celular durante a diferenciação, desenvolvimento celular e migração celular; *MAP2K3* (*mitogen-activated protein kinase 3*), que atua em respostas inflamatórias, processos metabólicos de citocinas e como regulador positivo da transcrição; *SREBF1* (*sterol regulatory element binding transcription factor 1*), atuando em processos metabólicos de esteróides e do colesterol; *TOP3A* (*topoisomerase [DNA] III alpha*), atuando na fase M do ciclo celular meiótico e na duplicação do DNA; *TNFRSF13B* (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B*), que atua na resposta imunitária como receptor do Fator de Necrose Tumoral (*TNF*); e *MAPK7* (*mitogen-activated protein kinase 7*), responsável pela morfogênese de órgãos e angiogênese.

Na região 17q25-qter encontramos os seguintes genes cujas funções são relevantes: *PDE6G* (*phosphodiesterase 6G, cGMP-specific, Rod, gamma*) que atua na cascata de sinalização intracelular e na transdução de sinais ligados a receptores de superfície celular; *BIRC5* (*baculoviral IAP repeat-containing 5 [survivin]*), responsável principalmente pela regulação negativa da apoptose, regulação do ciclo celular e checkpoint do ciclo celular; *CARD14* (*caspase recruitment domain family, member 14*), atuando principalmente na regulação da apoptose; *SOCS3* (*suppressor of cytokine signaling 3*), que atua na regulação negativa da apoptose e na regulação do crescimento celular; *CBX4* (*chromobox homolog 4 [PC class homolog, Drosophila]*) também atuando na regulação negativa da apoptose bem como na organização dos cromossomos; *PSCD1* (*pleckstrin homolog, Sec7 and coiled-coil domains 1 [cytohesin 1]*) responsável por adesão celular e transdução de sinal da proteína ras; *MAFG* (*v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G [avian]*), que atua na

morfogênese de tecidos e no desenvolvimento epidérmico; e *LGALS3BP* (*lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein*), responsável pela adesão celular e comunicação celular.

Estes dados evidenciam que as regiões alteradas mais significativas observadas neste trabalho contêm genes candidatos que controlam processos celulares.

A metodologia de CGH mostrou-se eficaz para a identificação de regiões críticas e genes possivelmente relacionados à fisiopatologia da endometriose. Em estudo piloto realizado, investigamos três genes - *VEGFB*, *BIRC5* e *TNFRSF13B* – presentes nessas regiões críticas, pela técnica de PCR em tempo real. No entanto, os resultados preliminares obtidos não foram conclusivos (Meola, 2008; *personal communication*).

Esta foi a primeira investigação de perdas e ganhos cromossômicos utilizando a metodologia de CGH em amostras de pacientes brasileiras com endometriose. Também não há na literatura relatos de um estudo caso-controle autólogo envolvendo amostras de endometriose ovariana e endométrio normal das mesmas pacientes, investigadas pela técnica de CGH. A detecção de regiões cromossômicas é etapa fundamental para a identificação futura de genes relacionados ao desenvolvimento da doença e de marcadores moleculares para diagnóstico da doença.

## ***Conclusões***

## CONCLUSÕES

(1) A técnica de CGH permitiu a identificação de perdas e ganhos em diferentes regiões cromossômicas, sendo que o cariótipo foi normal em 30% das amostras de endometriomas ovarianos e em 40% das amostras de endométrio eutópico das pacientes com diagnóstico de endometriose.

(2) A presença de perdas e ganhos de regiões cromossômicas no endométrio eutópico, histologicamente normal, de mulheres com endometriose ovariana, pode ser considerada como alteração primária ao desenvolvimento da doença.

(3) As regiões cromossômicas de alterações significativas detectadas em amostras de tecido endometrial eutópico e ectópico contém diversos genes relacionados à adesão celular, resposta imunitária, proliferação celular e controle da apoptose.

(4) A metodologia de CGH permitiu a detecção das regiões cromossômicas 11q12.3-q13.1, 17p11.1-p12 e 17q25.3-qter como regiões críticas, direcionando investigações futuras para identificação de genes associados à endometriose.

## ***Referências***

## REFERÊNCIAS

AL-FOZAN, H.; TULANDI, T. Left lateral predisposition of endometriosis and endometrioma. **Obstet Gynecol**, v.101, n.1, p.164-6, Jan, 2003.

AL-SHAHROUR, F., MINGUEZ, P., TARRAGA, J., MONTANER, D., ALLOZA, E., VAQUERIZAS, J. M., CONDE, L., BLASCHKE, C., VERA, J.; DOPAZO, J. BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. **Nucleic Acids Res**, v.34, n.Web Server issue, p.W472-6, Jul 1, 2006.

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. **Fertil Steril**, v.67, n.5, p.817-21, May, 1997.

BELIARD, A., DONNEZ, J., NISOLLE, M.; FOIDART, J. M. Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. **Fertil Steril**, v.67, n.2, p.266-72, Feb, 1997.

BERGQVIST, A., BORG, A.; LJUNGBERG, O. Protooncogenes in endometriotic and endometrial tissue. **Ann N Y Acad Sci**, v.626, p.276-83, 1991.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Principles of physiology**. St. Louis: Mosby. 1990. x, 690 p. p.

BISCHOFF, F.; SIMPSON, J. L. Genetics of endometriosis: heritability and candidate genes. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v.18, n.2, p.219-32, Apr, 2004.

BLANCATO, J. K. Fluorescence In Situ Hybridization. In: GERSEN, S. L.; KEAGLE, M. B. **The principles of clinical cytogenetics**. Totowa, N.J.: Humana Press, 1999. p.443-471

BLUMENFELD, Z. Hormonal suppressive therapy for endometriosis may not improve patient health. **Fertil Steril**, v.81, n.3, p.487-92, Mar, 2004.

BRAUN, D. P.; DMOWSKI, W. P. Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v.10, n.5, p.365-9, Oct, 1998.

BRINTON, L. A., GRIDLEY, G., PERSSON, I., BARON, J.; BERGQVIST, A. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. **Am J Obstet Gynecol**, v.176, n.3, p.572-9, Mar, 1997.

BROSENS, I., PUTTEMANS, P., CAMPO, R., GORDTS, S.; KINKEL, K. Diagnosis of endometriosis: pelvic endoscopy and imaging techniques. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v.18, n.2, p.285-303, Apr, 2004.



BULUN, S. E., ZEITOUN, K. M., TAKAYAMA, K.; SASANO, H. Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance. **J Mol Endocrinol**, v.25, n.1, p.35-42, Aug, 2000.

CAMPBELL, I. G.; THOMAS, E. J. Endometriosis: candidate genes. **Hum Reprod Update**, v.7, n.1, p.15-20, Jan-Feb, 2001.

COLLINET, P., DECANter, C., LEFEBVRE, C., LEROY, J. L.; VINATIER, D. [Endometriosis and infertility]. **Gynecol Obstet Fertil**, v.34, n.5, p.379-84, May, 2006.

CORNILLIE, F. J., OOSTERLYNCK, D., LAUWERYNS, J. M.; KONINCKX, P. R. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. **Fertil Steril**, v.53, n.6, p.978-83, Jun, 1990.

COTTREAU, C. M., NESS, R. B., MODUGNO, F., ALLEN, G. O.; GOODMAN, M. T. Endometriosis and its treatment with danazol or lupron in relation to ovarian cancer. **Clin Cancer Res**, v.9, n.14, p.5142-4, Nov 1, 2003.

CRAMER, D. W., HORNSTEIN, M. D., NG, W. G.; BARBIERI, R. L. Endometriosis associated with the N314D mutation of galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT). **Mol Hum Reprod**, v.2, n.3, p.149-52, Mar, 1996.

D'HOOGHE, T. M., SCHEERLINCK, J. P., KONINCKX, P. R., HILL, J. A.; BAMBRA, C. S. Anti-endometrial lymphocytotoxicity and natural killer cell activity in baboons (*Papio anubis* and *Papio cynocephalus*) with endometriosis. **Hum Reprod**, v.10, n.3, p.558-62, Mar, 1995.

DABROSIN, C., GYORFFY, S., MARGETTS, P., ROSS, C.; GAULDIE, J. Therapeutic effect of angiostatin gene transfer in a murine model of endometriosis. **Am J Pathol**, v.161, n.3, p.909-18, Sep, 2002.

DANGEL, A., MEDCHILL, M. T., DAVIS, G., MELONI, A. M.; SANDBERG, A. A. Cytogenetic studies in endometriosis tissue. **Cancer Genet Cytogenet**, v.78, n.2, p.172-4, Dec, 1994.

DARROW, S. L., VENA, J. E., BATT, R. E., ZIELEZNY, M. A., MICHALEK, A. M.; SELMAN, S. Menstrual cycle characteristics and the risk of endometriosis. **Epidemiology**, v.4, n.2, p.135-42, Mar, 1993.

DEPRIEST, P. D., BANKS, E. R., POWELL, D. E., VAN NAGELL, J. R., JR., GALLION, H. H., PULS, L. E., HUNTER, J. E., KRYSICIO, R. J.; ROYALTY, M. B. Endometrioid carcinoma of the ovary and endometriosis: the association in postmenopausal women. **Gynecol Oncol**, v.47, n.1, p.71-5, Oct, 1992.

DONNEZ, J., SMOES, P., GILLEROT, S., CASANAS-ROUX, F.; NISOLLE, M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. **Hum Reprod**, v.13, n.6, p.1686-90, Jun, 1998.

ERZEN, M.; KOVACIC, J. Relationship between endometriosis and ovarian cancer. **Eur J Gynaecol Oncol**, v.19, n.6, p.553-5, 1998.

ERZEN, M., RAKAR, S., KLANCNIK, B.; SYRJANEN, K. Endometriosis-associated ovarian carcinoma (EAOC): an entity distinct from other ovarian carcinomas as suggested by a nested case-control study. **Gynecol Oncol**, v.83, n.1, p.100-8, Oct, 2001.

FEELEY, K. M.; WELLS, M. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. **Histopathology**, v.38, n.2, p.87-95, Feb, 2001.

FERRARI, I. **Estudo das alterações cromossômicas em pacientes portadores de anomalias físicas múltiplas e retardo mental**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1968.

FERRERO, S., RAGNI, N.; REMORGIDA, V. Antiangiogenic therapies in endometriosis. **Br J Pharmacol**, v.149, n.2, p.133-5, Sep, 2006.

GAETJE, R., KOTZIAN, S., HERRMANN, G., BAUMANN, R.; STARZINSKI-POWITZ, A. Invasiveness of endometriotic cells in vitro. **Lancet**, v.346, n.8988, p.1463-4, Dec 2, 1995.

GEBEL, H. M., BRAUN, D. P., TAMBUR, A., FRAME, D., RANA, N.; DMOWSKI, W. P. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. **Fertil Steril**, v.69, n.6, p.1042-7, Jun, 1998.

GIUDICE, L. C.; KAO, L. C. Endometriosis. **Lancet**, v.364, n.9447, p.1789-99, Nov 13-19, 2004.

GOGUSEV, J., BOUQUET DE JOLINIÈRE, J., TELVI, L., DOUSSAU, M., DU MANOIR, S., STOJKOSKI, A.; LEVARDON, M. Detection of DNA copy number changes in human endometriosis by comparative genomic hybridization. **Hum Genet**, v.105, n.5, p.444-51, Nov, 1999.

GOGUSEV, J., BOUQUET DE JOLINIÈRE, J., TELVI, L., DOUSSAU, M., DU MANOIR, S., STOJKOSKI, A.; LEVARDON, M. Genetic abnormalities detected by comparative genomic hybridization in a human endometriosis-derived cell line. **Mol Hum Reprod**, v.6, n.9, p.821-7, Sep, 2000.

GRIMES, G. R., WEN, T. Q., MEWISSEN, M., BAXTER, R. M., MOODIE, S., BEATTIE, J. S.; GHAZAL, P. PDQ Wizard: automated prioritization and characterization of gene and protein lists using biomedical literature. **Bioinformatics**, v.22, n.16, p.2055-7, Aug 15, 2006.

GUO, S. W., WU, Y., STRAWN, E., BASIR, Z., WANG, Y., HALVERSON, G., MONTGOMERY, K.; KAJDACSÝ-BALLA, A. Genomic alterations in the endometrium may be a proximate cause for endometriosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.116, n.1, p.89-99, Sep 10, 2004.

HADFIELD, R. M., MANEK, S., NAKAGO, S., MUKHERJEE, S., WEEKS, D. E., MARDON, H. J., BARLOW, D. H.; KENNEDY, S. H. Absence of a relationship between endometriosis and the N314D polymorphism of galactose-1-phosphate uridyl transferase in a UK population. **Mol Hum Reprod**, v.5, n.10, p.990-3, Oct, 1999.

HADFIELD, R. M., MARDON, H. J., BARLOW, D. H.; KENNEDY, S. H. Endometriosis in monozygotic twins. **Fertil Steril**, v.68, n.5, p.941-2, Nov, 1997.

HEALY, D. L., ROGERS, P. A., HII, L.; WINGFIELD, M. Angiogenesis: a new theory for endometriosis. **Hum Reprod Update**, v.4, n.5, p.736-40, Sep-Oct, 1998.

HENRIET, P., CORNET, P. B., LEMOINE, P., GALANT, C., SINGER, C. F., COURTOY, P. J., EECKHOUT, Y.; MARBAIX, E. Circulating ovarian steroids and endometrial matrix metalloproteinases (MMPs). **Ann N Y Acad Sci**, v.955, p.119-38; discussion 157-8, 396-406, Mar, 2002.

HOUSTON, D. E., NOLLER, K. L., MELTON, L. J., 3RD; SELWYN, B. J. The epidemiology of pelvic endometriosis. **Clin Obstet Gynecol**, v.31, n.4, p.787-800, Dec, 1988.

HUANG, J. C.; YEH, J. Quantitative analysis of epidermal growth factor receptor gene expression in endometriosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v.79, n.4, p.1097-101, Oct, 1994.

JIANG, X., HITCHCOCK, A., BRYAN, E. J., WATSON, R. H., ENGLEFIELD, P., THOMAS, E. J.; CAMPBELL, I. G. Microsatellite analysis of endometriosis reveals loss of heterozygosity at candidate ovarian tumor suppressor gene loci. **Cancer Res**, v.56, n.15, p.3534-9, Aug 1, 1996.

JIANG, X., MORLAND, S. J., HITCHCOCK, A., THOMAS, E. J.; CAMPBELL, I. G. Allelotyping of endometriosis with adjacent ovarian carcinoma reveals evidence of a common lineage. **Cancer Res**, v.58, n.8, p.1707-12, Apr 15, 1998.

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**, v.150, n.4, p.1173-8, Apr, 1997.

JIMBO, H., YOSHIKAWA, H., ONDA, T., YASUGI, T., SAKAMOTO, A.; TAKETANI, Y. Prevalence of ovarian endometriosis in epithelial ovarian cancer. **Int J Gynaecol Obstet**, v.59, n.3, p.245-50, Dec, 1997.

KALLIONIEMI, A., KALLIONIEMI, O. P., SUDAR, D., RUTOVITZ, D., GRAY, J. W., WALDMAN, F.; PINKEL, D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. **Science**, v.258, n.5083, p.818-21, Oct 30, 1992.

KEETTEL, W. C.; STEIN, R. J. The viability of the cast-off menstrual endometrium. **Am J Obstet Gynecol**, v.61, n.2, p.440-2, Feb, 1951.

KOMIYAMA, S., AOKI, D., TOMINAGA, E., SUSUMU, N., UDAGAWA, Y.; NOZAWA, S. Prognosis of Japanese patients with ovarian clear cell carcinoma associated with pelvic endometriosis: clinicopathologic evaluation. **Gynecol Oncol**, v.72, n.3, p.342-6, Mar, 1999.

LEBOVIC, D. I., BALDOCCHI, R. A., MUELLER, M. D.; TAYLOR, R. N. Altered expression of a cell-cycle suppressor gene, Tob-1, in endometriotic cells by cDNA array analyses. **Fertil Steril**, v.78, n.4, p.849-54, Oct, 2002.

LESSEY, B. A. Implantation defects in infertile women with endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, v.955, p.265-80; discussion 293-5, 396-406, Mar, 2002.

LIU, D. T.; HITCHCOCK, A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. **Br J Obstet Gynaecol**, v.93, n.8, p.859-62, Aug, 1986.

LIU, J., TSAI, Y. L., ZHENG, X. Z., YAZIGI, R. A., BARAMKI, T. A., COMPTON, G.; KATZ, E. Feasibility study of repeated fluorescent in-situ hybridization in the same human blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. **Mol Hum Reprod**, v.4, n.10, p.972-7, Oct, 1998.

MARTINI, M., CICCARONE, M., GARGANESE, G., MAGGIORE, C., EVANGELISTA, A., RAHIMI, S., ZANNONI, G., VITTORI, G.; LAROCCA, L. M. Possible involvement of hMLH1, p16(INK4a) and PTEN in the malignant transformation of endometriosis. **Int J Cancer**, v.102, n.4, p.398-406, Dec 1, 2002.

MCLAREN, J., PRENTICE, A., CHARNOCK-JONES, D. S.; SMITH, S. K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. **Hum Reprod**, v.11, n.1, p.220-3, Jan, 1996.

MCMEEKIN, D. S., BURGER, R. A., MANETTA, A., DISAIA, P.; BERMAN, M. L. Endometrioid adenocarcinoma of the ovary and its relationship to endometriosis. **Gynecol Oncol**, v.59, n.1, p.81-6, Oct, 1995.

MHAWECH, P., KINKEL, K., VLASTOS, G.; PELTE, M. F. Ovarian carcinomas in endometriosis: an immunohistochemical and comparative genomic hybridization study. **Int J Gynecol Pathol**, v.21, n.4, p.401-6, Oct, 2002.

MISSMER, S. A.; CRAMER, D. W. The epidemiology of endometriosis. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v.30, n.1, p.1-19, vii, Mar, 2003.

MODUGNO, F., NESS, R. B., ALLEN, G. O., SCHILDKRAUT, J. M., DAVIS, F. G.; GOODMAN, M. T. Oral contraceptive use, reproductive history, and risk of epithelial ovarian cancer in women with and without endometriosis. **Am J Obstet Gynecol**, v.191, n.3, p.733-40, Sep, 2004.

MOGHISSI, K. S. Medical treatment of endometriosis. **Clin Obstet Gynecol**, v.42, n.3, p.620-32, Sep, 1999.

MOORHEAD, P. S., NOWELL, P. C., MELLMAN, W. J., BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp Cell Res**, v.20, p.613-6, Sep, 1960.

MORLAND, S. J., JIANG, X., HITCHCOCK, A., THOMAS, E. J.; CAMPBELL, I. G. Mutation of galactose-1-phosphate uridylyl transferase and its association with ovarian cancer and endometriosis. **Int J Cancer**, v.77, n.6, p.825-7, Sep 11, 1998.

MUTTER, G. L., LIN, M. C., FITZGERALD, J. T., KUM, J. B., BAAK, J. P., LEES, J. A., WENG, L. P.; ENG, C. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. **J Natl Cancer Inst**, v.92, n.11, p.924-30, Jun 7, 2000.

NAP, A. W., GROOTHUIS, P. G., DEMIR, A. Y., EVERS, J. L.; DUNSELMAN, G. A. Pathogenesis of endometriosis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v.18, n.2, p.233-44, Apr, 2004.

NESS, R. B., CRAMER, D. W., GOODMAN, M. T., KJAER, S. K., MALLIN, K., MOSGAARD, B. J., PURDIE, D. M., RISCH, H. A., VERGONA, R.; WU, A. H. Infertility, fertility drugs, and ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. **Am J Epidemiol**, v.155, n.3, p.217-24, Feb 1, 2002.

NESS, R. B., GRISSO, J. A., COTTREAU, C., KLAPPER, J., VERGONA, R., WHEELER, J. E., MORGAN, M.; SCHLESSELMAN, J. J. Factors related to inflammation of the ovarian epithelium and risk of ovarian cancer. **Epidemiology**, v.11, n.2, p.111-7, Mar, 2000.

NEZHAT, F., COHEN, C., RAHAMAN, J., GRETZ, H., COLE, P.; KALIR, T. Comparative immunohistochemical studies of bcl-2 and p53 proteins in benign and malignant ovarian endometriotic cysts. **Cancer**, v.94, n.11, p.2935-40, Jun 1, 2002.

NISHIDA, M., WATANABE, K., SATO, N.; ICHIKAWA, Y. Malignant transformation of ovarian endometriosis. **Gynecol Obstet Invest**, v.50 Suppl 1, p.18-25, 2000.

NISOLLE, M.; DONNEZ, J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. **Fertil Steril**, v.68, n.4, p.585-96, Oct, 1997.

OBATA, K., MORLAND, S. J., WATSON, R. H., HITCHCOCK, A., CHENEVIX-TRENCH, G., THOMAS, E. J.; CAMPBELL, I. G. Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. **Cancer Res**, v.58, n.10, p.2095-7, May 15, 1998.

OKUDA, T., OTSUKA, J., SEKIZAWA, A., SAITO, H., MAKINO, R., KUSHIMA, M., FARINA, A., KUWANO, Y.; OKAI, T. p53 mutations and overexpression affect

prognosis of ovarian endometrioid cancer but not clear cell cancer. **Gynecol Oncol**, v.88, n.3, p.318-25, Mar, 2003.

OLIVE, D. L.; PRITTS, E. A. Treatment of endometriosis. **N Engl J Med**, v.345, n.4, p.266-75, Jul 26, 2001.

OLIVE, D. L.; SCHWARTZ, L. B. Endometriosis. **N Engl J Med**, v.328, n.24, p.1759-69, Jun 17, 1993.

OMORI, S., YOSHIDA, S., KENNEDY, S. H., NEGORO, K., HAMANA, S., BARLOW, D. H.; MARUO, T. Polymorphism at codon 72 of the p53 gene is not associated with endometriosis in a Japanese population. **J Soc Gynecol Investig**, v.11, n.4, p.232-6, May, 2004.

OSTEEN, K. G., BRUNER-TRAN, K. L., KELLER, N. R.; EISENBERG, E. Progesterone-mediated endometrial maturation limits matrix metalloproteinase (MMP) expression in an inflammatory-like environment: a regulatory system altered in endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, v.955, p.37-47; discussion 86-8, 396-406, Mar, 2002.

POLINESS, A. E., HEALEY, M. G., BRENECKE, S. P.; MOSES, E. K. Proteomic approaches in endometriosis research. **Proteomics**, v.4, n.7, p.1897-902, Jul, 2004.

RIDLEY, J. H.; EDWARDS, I. K. Experimental endometriosis in the human. **Am J Obstet Gynecol**, v.76, n.4, p.783-9; discussion 789-90, Oct, 1958.

RISCH, H. A. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. **J Natl Cancer Inst**, v.90, n.23, p.1774-86, Dec 2, 1998.

ROSENFELD, D. L.; LECHER, B. D. Endometriosis in a patient with Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. **Am J Obstet Gynecol**, v.139, n.1, p.105, Jan, 1981.

SAINZ DE LA CUESTA, R., IZQUIERDO, M., CANAMERO, M., GRANIZO, J. J.; MANZARBEITIA, F. Increased prevalence of p53 overexpression from typical endometriosis to atypical endometriosis and ovarian cancer associated with endometriosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.113, n.1, p.87-93, Mar 15, 2004.

SAMPSON, J. A. Endometrial carcinoma of the ovary, arising in endometrial tissue in that organ. **Arch Surg**, v.10, p.1-17, 1925.

SAMPSON, J. A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.14, p.422-469, 1927.

SARHANIS, P., REDMAN, C., PERRETT, C., BRANNIGAN, K., CLAYTON, R. N., HAND, P., MUSGROVE, C., SUAREZ, V., JONES, P., FRYER, A. A., FARRELL, W. E.; STRANGE, R. C. Epithelial ovarian cancer: influence of polymorphism at the

glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 loci on p53 expression. **Br J Cancer**, v.74, n.11, p.1757-61, Dec, 1996.

SCHENKEN, R. S., JOHNSON, J. V.; RIEHL, R. M. c-myc protooncogene polypeptide expression in endometriosis. **Am J Obstet Gynecol**, v.164, n.4, p.1031-6; discussion 1036-7, Apr, 1991.

SCHNEIDER, J., JIMENEZ, E., RODRIGUEZ, F.; DEL TANAGO, J. G. c-myc, c-erb-B2, nm23 and p53 expression in human endometriosis. **Oncol Rep**, v.5, n.1, p.49-52, Jan-Feb, 1998.

SHIN, J. C., ROSS, H. L., ELIAS, S., NGUYEN, D. D., MITCHELL-LEEF, D., SIMPSON, J. L.; BISCHOFF, F. Z. Detection of chromosomal aneuploidy in endometriosis by multi-color fluorescence in situ hybridization (FISH). **Hum Genet**, v.100, n.3-4, p.401-6, Sep, 1997.

SOMIGLIANA, E., VIGANO, P., PARAZZINI, F., STOPPELLI, S., GIAMBATTISTA, E.; VERCELLINI, P. Association between endometriosis and cancer: a comprehensive review and a critical analysis of clinical and epidemiological evidence. **Gynecol Oncol**, v.101, n.2, p.331-41, May, 2006.

SQUIRE, J. A.; PERLIKOWSKI, S. Molecular cytogenetics in modern pathology. In: KIRKHAM, N.; LEMOINE, N. R. **Progress in pathology**. Toronto: Churchill Livingstone, v.4, 1998. p.1-17

STEFANSSON, H., EINARSDOTTIR, A., GEIRSSON, R. T., JONSDOTTIR, K., SVERRISDOTTIR, G., GUDNADOTTIR, V. G., GUNNARSDOTTIR, S., MANOLESCU, A., GULCHER, J.; STEFANSSON, K. Endometriosis is not associated with or linked to the GALT gene. **Fertil Steril**, v.76, n.5, p.1019-22, Nov, 2001.

STOECKLEIN, N. H., ERBERSDOBLER, A., SCHMIDT-KITTLER, O., DIEBOLD, J., SCHARDT, J. A., IZBICKI, J. R.; KLEIN, C. A. SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. **Am J Pathol**, v.161, n.1, p.43-51, Jul, 2002.

SWIERSZ, L. M. Role of endometriosis in cancer and tumor development. **Ann N Y Acad Sci**, v.955, p.281-92; discussion 293-5, 396-406, Mar, 2002.

TAMURA, M., FUKAYA, T., MURAKAMI, T., UEHARA, S.; YAJIMA, A. Analysis of clonality in human endometriotic cysts based on evaluation of X chromosome inactivation in archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. **Lab Invest**, v.78, n.2, p.213-8, Feb, 1998.

TAN, X. J., LANG, J. H., LIU, D. Y., SHEN, K., LENG, J. H.; ZHU, L. Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in patients with endometriosis. **Fertil Steril**, v.78, n.1, p.148-53, Jul, 2002.

TARKOWSKI, R., KOTARSKI, J., POLAK, G.; WOJCIEROWSKI, J. [Expression of the survivin gene in the scar endometriosis and in normal human endometrium]. **Ginekol Pol**, v.72, n.12A, p.1539-42, Dec, 2001.

THE PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Endometriosis and infertility. **Fertil Steril**, v.81, n.5, p.1441-6, May, 2004.

THOMAS, E. J.; CAMPBELL, I. G. Evidence that endometriosis behaves in a malignant manner. **Gynecol Obstet Invest**, v.50 Suppl 1, p.2-10, 2000a.

THOMAS, E. J.; CAMPBELL, I. G. Molecular genetic defects in endometriosis. **Gynecol Obstet Invest**, v.50 Suppl 1, p.44-50, 2000b.

TOKI, T.; NAKAYAMA, K. Proliferative activity and genetic alterations in TP53 in endometriosis. **Gynecol Obstet Invest**, v.50 Suppl 1, p.33-8, 2000.

VALENZUELA, P., RAMOS, P., REDONDO, S., CABRERA, Y., ALVAREZ, I.; RUIZ, A. Endometrioid adenocarcinoma of the ovary and endometriosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.134, n.1, p.83-6, Sep, 2007.

VAN GORP T, A. F., NEVEN P, VERGOTE I, MOERMAN P Endometriosis and the development of malignant tumours of the pelvis: a review of the literature. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** v.18, p.349-371, 2004.

VERCELLINI, P., TRECCA, D., OLDANI, S., FRACCHIOLLA, N. S., NERI, A.; CROSIGNANI, P. G. Analysis of p53 and ras gene mutations in endometriosis. **Gynecol Obstet Invest**, v.38, n.1, p.70-1, 1994.

VIGANO, P., PARAZZINI, F., SOMIGLIANA, E.; VERCELLINI, P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v.18, n.2, p.177-200, Apr, 2004.

VIGANO, P., SOMIGLIANA, E., CHIODO, I., ABBIATI, A.; VERCELLINI, P. Molecular mechanisms and biological plausibility underlying the malignant transformation of endometriosis: a critical analysis. **Hum Reprod Update**, v.12, n.1, p.77-89, Jan-Feb, 2006.

WITZ, C. A. Current concepts in the pathogenesis of endometriosis. **Clin Obstet Gynecol**, v.42, n.3, p.566-85, Sep, 1999.

WU, Y., STRAWN, E., BASIR, Z., WANG, Y., HALVERSON, G., JAILWALA, P.; GUO, S. W. Genomic alterations in ectopic and eutopic endometria of women with endometriosis. **Gynecol Obstet Invest**, v.62, n.3, p.148-59, 2006.

YANG, W. C., CHEN, H. W., AU, H. K., CHANG, C. W., HUANG, C. T., YEN, Y. H.; TZENG, C. R. Serum and endometrial markers. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v.18, n.2, p.305-18, Apr, 2004.



***Manuscrito submetido  
para publicação***

**Title Page****Running Title:** Genomic imbalance and endometriosis**Title:** Genomic alterations detected by Comparative Genomic Hybridization in Ovarian Endometriosis**Authors:** Luciana Caricati Veiga, MSc.<sup>a</sup>Julio César Rosa e Silva, MD, PhD.<sup>b</sup>Juliana Meola, MSc.<sup>a</sup>Jeremy Squire, PhD.<sup>c</sup>Rui Alberto Ferriani, MD, PhD.<sup>b</sup>Maisa Yoshimoto, PhD.<sup>c</sup>Silvio Avelino dos Santos <sup>a</sup>Lucia Martelli, MD, PhD.<sup>a</sup>

This study was performed in the Laboratory of Molecular Cytogenetics, Department of Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto (FMRP-USP), Brazil and in the Division of Applied Molecular Oncology from the Princess Margaret Hospital, Ontario Cancer Institute, University Health Network, Toronto, Canada.

**Department affiliations:**

<sup>a</sup> Department of Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 14049-900, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 14049-900, Brazil.

<sup>c</sup> Division of Applied Molecular Oncology from the Princess Margaret Hospital, Ontario Cancer Institute, University Health Network, Toronto, Canada.

**Financial support:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasília, Distrito Federal, Brazil; and Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência

(FAEPA/HCFMRP-USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. JAS and MY were supported by the National Cancer Institute of Canada with funds from the Canadian Cancer Society.

## **ABSTRACT**

**Objective:** To identify genomic alterations in ectopic and eutopic endometrial tissue of women with ovarian endometriosis.

**Design:** The comparison of genomic data detected in each type of tissue.

**Setting:** University hospital.

**Patients:** Ten patients with confirmed diagnosis of endometriosis.

**Interventions:** Comparative Genomic Hybridization (CGH) was performed to identify genomic alterations in the ectopic and eutopic tissues from the same patients.

**Main Outcome Measures:** Gain and loss of chromosomal regions by Comparative Genomic Hybridization analysis.

**Results and Conclusions:** In the eutopic group, 6/10 samples presented alterations and 7/10 cases showed alterations in the ectopic tissue. The presence of losses and gains of chromosomal regions in the histologically normal eutopic endometrium from women with ovarian endometriosis can be considered as a primary alteration in the development of the disease. The CGH methodology allowed the detection of 11q12.3-q13.1, 17p11.1-p12 and 17q25.3-qter as critical regions, leading to future investigations for the identification of genes associated to endometriosis.

**KEYWORDS:** endometriosis, infertility, comparative genomic hybridization, cytogenetics, endometrium.

## INTRODUCTION

Endometriosis is a common benign gynecological disorder, very aggressive, characterized by the presence of ectopic endometrial tissue. The ectopic tissue is histologically identical to the normal (eutopic), differing in functional and biochemical aspects. It is characterized by dysmenorrhea, dyspareunia, pelvic pain and infertility or a total absence of symptoms (1, 2).

It is reported that around 10% of the female population and 50% of the patients with infertility and pelvic pain present endometriosis. This incidence increases along the reproductive age, it is rare before menarche and tends to decrease after menopause. In addition, a polygenic and multifactorial tendency has been reported, as well as a higher risk for the disease (5-8%) in women with family history of the disease in first grade relatives (3, 4).

Although it is one of the most studied gynecological abnormalities, its etiology has not been clarified. The most popular theory to explain it is Sampson's implantation theory, which postulates that the endometrial cells exfoliated during menstruation suffer reflux through the uterine tubes, adhere and proliferate in ectopic sites, mainly peritoneum, ovary and retrovaginal septum (5). On the other hand, considering retrograde menstruation as a nearly universal phenomenon, it is difficult to explain why only a fraction of women develops endometriosis. Gebel et al. (6) proposed that the percentage of menstrual endometriotic cells that suffer apoptosis in women with endometriosis is lower in comparison to the endometrial tissue of fertile controls, increasing the number of cells that survive and keeping physiological activity. Some studies suggest a multidimensional etiology including hereditary, hormonal and immunological factors (7, 8). At cellular level, the disease

is characterized by monoclonal growth and can present malignant features as local invasion and metastasis (9).

Endometriosis suffers malignant transformation in a frequency of 0.7% to 1%; however, this frequency can be even higher once the tumor can destroy the original endometriotic tissue and eliminate the histopathological evidences of endometriosis (10). Nevertheless, since endometriosis has been associated to infertility, the correlation between the disease and cancer must be carefully interpreted, as an increased risk might be due to nulliparity and not endometriosis per se (11).

#### *Comparative Genomic Hybridization and Endometriosis*

No specific chromosomal alteration has been identified in endometriotic tissue by karyotyping analysis, probably due to the limitations regarding the cell culture. (12). The comparative genomic hybridization (CGH) is a versatile technique that allows the whole genome to be analyzed in one single experiment, without the necessity of metaphase chromosomes from the sample, eliminating the cell culture (13).

There are some reports on CGH as a tool for the detection of genetic alterations in endometriosis. Gogusev et al. (14) examined 18 endometriotic lesions from patients in advanced stage of the disease, and recurrent alterations in gene copy number were found in 15 out of 18 cases (83%). Genomic losses in chromosomes 1p and 22q were detected in 50% of the cases. Other common losses were observed at 5p, 6q, 7p, 9q, 16 and 17q. Gains were found at 1q, 6q, 7q and 17q. The same group also evaluated by CGH a permanent cell lineage derived from endometriosis (FbEM-1) and observed that gains were more common than losses, as

a significant increase in DNA sequence copy number was detected at 1q, 5p, 6p and 17q (15).

This methodology was also applied in the evaluation of genetic alterations in ovary carcinomas arising within endometriosis (16). Chromosome aberrations were observed in the three cases of ovary carcinomas, but no alteration was detected in the endometriotic tissue in neither the cases. The authors concluded that these altered regions might contain tumor suppressor genes or oncogenes responsible for the malignant transformation of endometriosis.

This study aimed to detect chromosomal imbalance, by CGH, in ectopic tissue samples from ovarian endometriomas and eutopic tissue from the same patients, and, consequently, the evaluation of gains and/or losses of chromosomal regions which might be involved in the developmental process of the disease.

## **MATERIAL AND METHODS**

This study was developed at the Laboratory of Molecular Cytogenetics, Department of Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto (FMRP-USP), Brazil, in association with the Department of Gynecology and Obstetrics (Human Reproduction Division) from the same institution, and at the Division of Applied Molecular Oncology from the Princess Margaret Hospital, Ontario Cancer Institute, University Health Network, Toronto, Canada. The project was approved by the Research Ethics Committee (CEP) of the University Hospital from the FMRP-USP, process number 11736/2004. Written informed consent was obtained from each patient.

### **Samples**

Twenty samples were collected from 10 patients following the inclusion criteria: women in reproductive age (24 to 45 years), with regular menstrual cycles (25 to 35 days of interval) and no history of any hormonal therapy during the last six months before the collection; the samples were obtained during the proliferative phase of the menstrual cycle (1<sup>st</sup> to 12<sup>th</sup> day).

The patients were divided into two groups: the eutopic group (control), where histological normal endometrial biopsies were collected using a Novak curette from 10 patients with confirmed diagnosis of endometriosis; and the ectopic group, composed by 10 ovarian endometriomas samples from the same patients, referred to our service by the Endoscopy and Pelvic Pain Ambulatory (AGDE) and the Infertility Ambulatory of the University Hospital of the FMRP-USP due to pelvic pain and/or infertility indication. All the biopsies were collected by laparoscopy and submitted to histopathological analysis. The patients' characterization concerning the lesion origin

and staging is observed in Table 1. The endometriosis stage was settled in agreement with the *American Society for Reproductive Medicine* classification (17). The samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  after cryopreservation treatment with *Tissue-Teck<sup>®</sup> O.C.T. Compound* (Sakura Finetek USA. Inc., Torrance, CA) for DNA extraction.

### **Comparative Genomic Hybridization**

The protocol for DNA amplification and labeling by SCOMP was performed as previously described with some modifications (18). Briefly, the probe (eutopic or ectopic endometrial tissue DNA) and normal reference DNA (Promega) were differentially labeled using, respectively, biotin-16-dUTP and digoxigenin-11-dUTP. Equal amounts (8 $\mu\text{g}$ ) of labeled endometriotic DNA, and normal reference DNA were co-precipitated with 10  $\mu\text{L}$  of Human Cot-1 DNA (1 mg/mL). The labeled probe DNA was resuspended in 12  $\mu\text{L}$  hybridization mixture composed of 100% formamide and 30% dextran sulfato/4xSSC. After denaturation, the labeled DNA probes were co-hybridized to normal human metaphase spreads prepared by phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood lymphocyte culture. The hybridization was carried out at  $37^{\circ}\text{C}$  for 72h. The slides were washed three times at  $45^{\circ}\text{C}$  for 5 min each in 50% formamide/2xSSC, followed by three washes at  $45^{\circ}\text{C}$  in 0.1% SDS/0.1xSSC and three washes at  $45^{\circ}\text{C}$  in 2xSSC. Biotinylated DNA sequences were visualized by fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated avidin whereas digoxigenin-labeled sequences were detected using anti-digoxigenin-rhodamine. Chromosome preparations were counterstained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI).



### **Digital image analysis**

The metaphases were examined using a epifluorescence microscope (Zeiss), captured and analyzed by the Metasystem (version 4.5.0.28) CGH program. For each sample, 20-30 images were captured, and the data from 10-12 representations of each chromosome were combined. Gains and losses of chromosomes or chromosomal regions were detected on the basis of the ratio profiles deviating from the green to red balance value of 1.0 within 0.8-1.2 limits. The threshold values were determined according to previous reports (14, 16). The centromeric, the heterochromatic regions and the short arm of acrocentric chromosomes were not included in the interpretation of gains and losses. Chromosome Y was also excluded from the analysis because the reference and test DNAs were from females.

## RESULTS

Twenty endometrial tissue samples, ten eutopic endometrial tissue samples and ten ovarian endometriomas, were analyzed by CGH. We have detected chromosomal alterations in both groups, summarized in Table 2. In the control group, 6/10 samples presented alterations, and in the ectopic group they were found in 7/10 cases. The alterations observed in the control group were loss at 9q (two cases) and gains at 1p (two cases), 1q (three cases), 2q, (one case), 9q (two cases), 11q (two cases), 12q (one case), 13p (one case), 14p (two cases), 14q (one case), 15p (one case), 17p (two cases), 17q (two cases), 19p (four cases), 19q (three cases), 20q (one case), 21p (one case), 21q (one case) and 22q (three cases). The endometriomas presented losses at 8p (one case), 9p (one case), 9q (three cases), 15q (one case) and gains at 1p (one case), 1q (three cases), 11q (two cases), 13p (one case), 14p (one case), 15p (one case), 16q (three cases), 17p (three cases), 18p (one case), 19p (three cases), 19q (two cases), 20q (one case), 21p (one case), 22q (one case) and Xq (one case).

Comparative analysis of eutopic and ectopic tissue from each patient showed two patients (O6/ON6 and O8/ON8) without alterations in both tissues. Two patients (O1/ON1 and O9/ON9) presented alteration only in the ectopic tissue, as loss at 9q in patient O1 and gain at 17p in patient O9. One patient (O5/ON5) presented alteration only in the eutopic tissue (gain in 1q). Chromosomal alterations were observed in both tissues in five patients (O2/ON2, O3/ON3, O4/ON4, O7/ON7 and O10/ON10). Patient O2/ON2 presented the same alteration (loss at 9q) both in the eutopic and in the ectopic tissue. Patient O3/ON3 showed loss at 9q as a common alteration in both tissues, however, gains at 19p and 22q were found only in the

eutopic tissue. All the alterations observed in the eutopic tissue (gain at 1q, 13p, 14p, 15p, 16q, 17p, 19p, 19q and 21p) from patient O4/ON4 were also found in the ectopic tissue, in which loss at 8p and 15q, and gain at 11q and Xq were also observed. Patient O7/ON7 presented gains at 1p, 11q, 19p, 19q and 22q in both tissues, but gains were observed at 2q, 9q, 12q, 14q, 17q and 21q only in the eutopic tissue and gains at 1q, 16q, 17p, 18p and 20q, as well as losses at 9p were reported only in the ectopic tissue. At last, patient O10/ON10 presented gain at 1q and 19p in both tissues, however, gain at 16q was found in the ectopic tissue and gains at 1p, 9q, 11q, 14p, 17p, 17q, 19q, 20q and 22q were found only in the eutopic tissue. The increased number of chromosomal alterations in patients O4/ON4, O7/ON7 and O10/ON10 did not show any correlation to the symptoms severity or poor prognosis. None of the patients presented ovarian tumor within a three-year-follow up.

Figures 1 and 2 illustrate all the alterations found in the ectopic and eutopic groups respectively. Chromosomes 3, 4, 5, 6, 7 and 10 did not show alteration. Chromosomal regions 1p33-pter, 11q12-q13.1, 17p11.1-p12, 17q25-qter, 19, 20q11.23-qter and 22q11.2-qter presented significant alterations. The regions 11q, 17p and 17q were selected as critical regions because they involve non-centromeric regions (or any other repetitive sequence region) and were detected in more than one sample.

Moreover, some aberrations were previously described in normal tissues at 1p, 19 and 22, G-C rich regions known to produce false-positive results by CGH (16).

The lists of genes mapped to these regions were obtained in the database *Ensembl* (Sanger Institute, [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/index.html](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html)), at

specific G-banding intervals. The lists were obtained for regions: 11q12.3-q13.1, 17p11.1-p12 and 17q25.3-qter. All of them were used for the selection of relevant function genes that could somehow influence the occurrence or behavior of the endometriotic lesions.

The FatiGO Plus (FatiGO+) tool, from Babelomics on-line system (19), was used to stratify all loci in the regions of interest, according to their biological, biochemical, and functional properties. The PDQ-Wizard v.0.1 (20) on-line tool was used to cross match the list of genes with specific keywords ("endometriosis", "endometrium" or "ovarian carcinoma"), resulting in the identification of publications involving each specific gene.

## DISCUSSION

Many theories have been proposed to explain the etiology of endometriosis. Although the retrograde reflux is the most popular theory, some authors suggest a different theory for each one of the three types of endometriosis (21-23). It has been discussed that endometriosis has a genetic component and that acquired chromosome-specific aberrations could be involved in its pathogenesis. Genetic studies providing a complete screening of the genomic aberrations present in the endometriotic tissue, as well as in normal tissue from the patients, can be extremely informative in the search for a possible genetic marker for the disease.

In this study we evaluated 10 ovarian endometriomas samples (ectopic tissue) and 10 normal endometrial samples from the same patients (eutopic tissue) by the CGH methodology. Many alterations involving mainly gains of chromosomal regions were observed in both tissues. As far as we know, there are no reports regarding genomic losses and gains by CGH in Brazilian patients, comparing ovarian endometriomas and normal endometrium.

The literature is unclear about the genetics of endometriosis and there are few studies using CGH. There are reports of total absence of aberrations detected by CGH in all endometriosis samples (16) as well as the detection of gains and losses at chromosomal regions in 15 out of 18 endometriotic samples (83%), mainly losses at 1p32-36, 5p, 6q, 7p14-p22ter and 22q12.3-qter and gains at 6q and 17q (14). We found alterations in seven out of 10 ovarian endometriomas samples (70%) and, differently from others, we observed mainly gains at 1p, 1q, 11q, 13p, 14p, 15p, 16q, 17p, 18p, 19p, 19q, 20q, 21p, 22q and Xq and losses at 8p, 9p, 9q and 15q.

This discrepancy can be explained by the difference in the sample number and by the heterogeneity of the sample origin. Mhawech et al. (16) evaluated endometriotic tissue from patients with ovarian carcinoma arising within endometriosis and, despite of the poor prognosis, no chromosomal alteration was found in the endometriotic tissue. This suggests that there are no established correlations between genomic alterations and poor prognosis, although this study has been performed with only three patients. We also did not observe any correlation between either presence or absence of chromosomal alterations and clinical follow-up.

A study using array CGH showed that all the five samples analyzed presented many alterations in different chromosomes but mainly at 1p, 3p and 4p (24). Besides, there was a considerable diversity in the alterations among the patients, as they did not share any common alteration, probably due to the samples heterogeneity. Among our control group, corresponding to normal endometrium from the patients, 60% (6/10) presented chromosomal alterations involving loss at 9q and gains at 1p, 1q, 2q, 9q, 11q, 12q, 13p, 14p, 14q, 15p, 16q, 17p, 17q, 19p, 19q, 20q, 21p, 21q and 22q. These results emphasize that the histologically normal endometrium from women with endometriosis present genomic alterations, as previously described (22). Moreover, in the majority of our samples, the alterations observed in the eutopic tissue were different from the ectopic tissue, with the exception of case O2/ON2 where loss at 9q was common to both tissues. In one case (O4/ON4), all alterations found in the normal tissue were also observed in the endometriotic tissue. In three other cases (O3/ON3, O7/ON7 and O10/ON10), both tissues shared only some alterations. This apparently lack of homogeneity could be a

reflex of the patients heterogeneity, or the possibility of multiple paths leading to endometriosis. The observation of different alterations in both tissues from the same patient challenges the applicability of Sampson's theory in our samples. By the retrograde reflux theory, it is supposed that the same alterations found in the normal endometrium were also found in the endometriotic tissue and this should present extra alterations responsible for adhesion, cell proliferation and angiogenesis, which would differentiate it from the histologically normal tissue.

The celomic metaplasia is one of the three theories that have been proposed to explain the pathogenesis of the typical ovarian endometriosis, in addition to the inversion and progressive invagination of the ovarian cortex after the accumulation of menstrual debris from bleeding of endometrial implants, which are located on the ovarian surface, and the secondary involvement of functional ovarian cysts by endometrial implants located on the ovarian surface (23). The celomic metaplasia hypothesis states that the original celomic membrane undergoes metaplasia, forming typical endometrial glands and stroma. This theory is supported by the description of endometriosis in Rokitansky-Küster-Hauser syndrome patients, who can not present retrograde menstruation (25).

Considering that peritoneal, ovarian and rectovaginal septum lesions are distinct, we observed alterations that can contribute to the development of the ovarian endometrioma, especially alterations at 11q12.3-q13.1, 17p11.1-p12 and 17q25-qter.

Some of these genomic alterations contain genes related to angiogenesis, cell cycle regulation, immune response and cell adhesion. At region 11q12.3-q13.1 there are many relevant genes such as: *RELA* (*v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene*

*homolog A, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3, p65 [avian]*), responsible for tissue development and in the negative control of apoptosis; *CFL1 (cofilin 1[non-muscle])*, that plays a role in cell differentiation and in the negative control of apoptosis; *SYVN1 (synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin)*, responsible for negative regulation of apoptosis; *VEGFB (vascular endothelial growth factor B)*, that plays a role in the positive regulation of cell proliferation and cell cycle regulation; *MARK2 (MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2)*, acting in cell morphogenesis and intracellular signaling pathways; and *HTATIP (HIV-1 Tat interacting protein)* responsible for cell growth regulation and signaling pathways of the androgen and steroid hormones receptors.

Region 17p11.1-p12 also contains relevant genes for the endometriosis process, such as *UBB (ubiquitin B)*, responsible for cell morphogenesis during differentiation and cell migration; *MAP2K3 (mitogen-activated protein kinase 3)*, that plays a role in inflammatory responses, cytokines metabolic processes and as a positive regulator of transcription; *SREBF1 (sterol regulatory element binding transcription factor 1)*, acting in steroid and cholesterol metabolic processes; *TOP3A (topoisomerase [DNA] III alpha)*, acting in the M phase of the meiotic cell cycle and DNA replication; *TNFRSF13B (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B)*, that plays a role in the immune response; and *MAPK7 (mitogen-activated protein kinase 7)*, responsible for organ morphogenesis and angiogenesis.

At region 17q25-qter we find the following genes, whose functions can be related to the endometriotic process: *PDE6G (phosphodiesterase 6G, cGMP-specific, Rod, gamma)* that plays a role in the intracellular signaling pathways and signal transduction related to cell surface receptors; *BIRC5 (baculoviral IAP repeat-*



*containing 5 [survivin]*), responsible mainly by negative regulation of apoptosis, and cell cycle regulation and checkpoint; *CARD14 (caspase recruitment domain family, member 14)*, acting mainly in the apoptosis regulation; *SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3)*, that plays a role in the negative regulation of apoptosis and cell growth regulation; *CBX4 (chromobox homolog 4 [PC class homolog, Drosophila])*, also acting in the negative regulation of apoptosis as well as in the chromosomal organization; *PSCD1 (pleckstrin homolog, Sec7 and coiled-coil domains 1 [cytohesin 1])* responsible for cell adhesion and ras protein signal transduction; *MAFG (v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G [avian])*, which acts in the tissue morphogenesis and epidermic development; and *LGALS3BP (lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein)*, responsible for cell adhesion, response to cell defense and cell communication.

This is the first investigation of chromosomal losses and gains by the CGH methodology in Brazilian endometriosis samples. Also, there is no report in the literature of an autologous case-control study regarding ovarian endometriosis samples and normal endometrium from the same patients.

The presence of losses and gains of chromosomal regions in the histologically normal eutopic endometrium from women with ovarian endometriosis can be considered as a primary alteration in the development of the disease. The CGH methodology allowed the detection of chromosomal regions 11q12.3-q13.1, 17p11.1-p12 and 17q25.3-qter as critical regions, leading to future investigations for the identification of genes associated to endometriosis.

## REFERENCES

1. Yang WC, Chen HW, Au HK, Chang CW, Huang CT, Yen YH, et al. Serum and endometrial markers. *Best practice & research*. 2004 Apr;18(2):305-18.
2. Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Evers JL, Dunselman GA. Pathogenesis of endometriosis. *Best practice & research*. 2004 Apr;18(2):233-44.
3. Dabrosin C, Gyorffy S, Margetts P, Ross C, Gauldie J. Therapeutic effect of angiostatin gene transfer in a murine model of endometriosis. *The American journal of pathology*. 2002 Sep;161(3):909-18.
4. Bischoff F, Simpson JL. Genetics of endometriosis: heritability and candidate genes. *Best practice & research*. 2004 Apr;18(2):219-32.
5. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1927;14:422-69.
6. Gebel HM, Braun DP, Tambur A, Frame D, Rana N, Dmowski WP. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertility and sterility*. 1998 Jun;69(6):1042-7.
7. Olive DL, Schwartz LB. Endometriosis. *The New England journal of medicine*. 1993 Jun 17;328(24):1759-69.
8. Brinton LA, Gridley G, Persson I, Baron J, Bergqvist A. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1997 Mar;176(3):572-9.
9. Jimbo H, Yoshikawa H, Onda T, Yasugi T, Sakamoto A, Taketani Y. Prevalence of ovarian endometriosis in epithelial ovarian cancer. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 1997 Dec;59(3):245-50.
10. Nishida M, Watanabe K, Sato N, Ichikawa Y. Malignant transformation of ovarian endometriosis. *Gynecologic and obstetric investigation*. 2000;50 Suppl 1:18-25.
11. Somigliana E, Vigano P, Parazzini F, Stoppelli S, Giambattista E, Vercellini P. Association between endometriosis and cancer: a comprehensive review and a

critical analysis of clinical and epidemiological evidence. *Gynecologic oncology*. 2006 May;101(2):331-41.

12. Dangel A, Medchill MT, Davis G, Meloni AM, Sandberg AA. Cytogenetic studies in endometriosis tissue. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1994 Dec;78(2):172-4.

13. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science (New York, NY)*. 1992 Oct 30;258(5083):818-21.

14. Gogusev J, Bouquet de Joliniere J, Telvi L, Doussau M, du Manoir S, Stojkoski A, et al. Detection of DNA copy number changes in human endometriosis by comparative genomic hybridization. *Human genetics*. 1999 Nov;105(5):444-51.

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

16. Mhawech P, Kinkel K, Vlastos G, Pelte MF. Ovarian carcinomas in endometriosis: an immunohistochemical and comparative genomic hybridization study. *Int J Gynecol Pathol*. 2002 Oct;21(4):401-6.

17. AmericanSocietyforReproductiveMedicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertility and sterility*. 1997 May;67(5):817-21.

18. Stoecklein NH, Erbersdobler A, Schmidt-Kittler O, Diebold J, Schardt JA, Izbicki JR, et al. SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *The American journal of pathology*. 2002 Jul;161(1):43-51.

19. Al-Shahrour F, Minguez P, Tarraga J, Montaner D, Alloza E, Vaquerizas JM, et al. BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic acids research*. 2006 Jul 1;34(Web Server issue):W472-6.

20. Grimes GR, Wen TQ, Mewissen M, Baxter RM, Moodie S, Beattie JS, et al. PDQ Wizard: automated prioritization and characterization of gene and protein lists using biomedical literature. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2006 Aug 15;22(16):2055-7.
21. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertility and sterility*. 1997 Oct;68(4):585-96.
22. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004 Nov 13-19;364(9447):1789-99.
23. Vigano P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best practice & research*. 2004 Apr;18(2):177-200.
24. Guo SW, Wu Y, Strawn E, Basir Z, Wang Y, Halverson G, et al. Genomic alterations in the endometrium may be a proximate cause for endometriosis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2004 Sep 10;116(1):89-99.
25. Rosenfeld DL, Lecher BD. Endometriosis in a patient with Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 1981 Jan;139(1):105.

Table 1: Clinical features of the 10 patients evaluated in this study.

<b>PATIENT</b>	<b>AGE</b>	<b>STAGE</b>	<b>CYCLE DAY</b>	<b>INDICATION</b>	<b>PREGNANCY</b>
O1/ON1	42	IV	11	PAIN	G5P4A1
O2/ON2	31	IV	7	INFERTILITY	G0
O3/ON3	45	IV	5	PAIN	G3P3A0
O4/ON4	24	IV	6	PAIN	G0
O5/ON5	42	III	7	PAIN	G2P2A0
O6/ON6	40	III	4	PAIN	G2P2A0
O7/ON7	36	IV	8	PAIN	G3P3A0
O8/ON8	35	III	5	INFERTILITY	G0
O9/ON9	35	IV	7	INFERTILITY	G2P0A2
O10/ON10	42	IV	8	PAIN	G2P2A0

Table 2: All chromosomal aberrations detected by CGH in the ectopic and eutopic sample groups.

<i>ECTOPIC</i>		<i>EUTOPIC</i>	
<b>O1</b>	-9q	<b>ON1</b>	-
<b>O2</b>	-9q	<b>ON2</b>	-9q
<b>O3</b>	-9q	<b>ON3</b>	-9q, +19p, +22q
<b>O4</b>	+1q, -8p, +11q, +13p, +14p, +15p, -15q, +16q, +17p, +19p, +19q, +21p, +Xq	<b>ON4</b>	+1q, +13p, +14p, +15p, +16q, +17p, +19p, +19q, +21p
<b>O5</b>	-	<b>ON5</b>	+1q
<b>O6</b>	-	<b>ON6</b>	-
<b>O8</b>	-	<b>ON8</b>	-
<b>O9</b>	+17p	<b>ON9</b>	-
<b>O10</b>	+1q, +16q, +19p	<b>ON10</b>	+1p, +1q, +9q, +11q, +14p, +17p, +17q, +19p, +19q, +20q, +22q
<b>O11</b>	+1p, +1q, -9p, +11q, +16q, +17p, +18p, +19p, +19q, +20q, +22q	<b>ON11</b>	+1p, +2q, +9q, +11q, +12q, +14q, +17q, +19p, +19q, +21q, +22q

(-): loss; (+): gain, red: loss, green: gain.

O = ovarian endometrioma tissue; ON = normal endometrium tissue from the same patients with ovarian endometrioma.

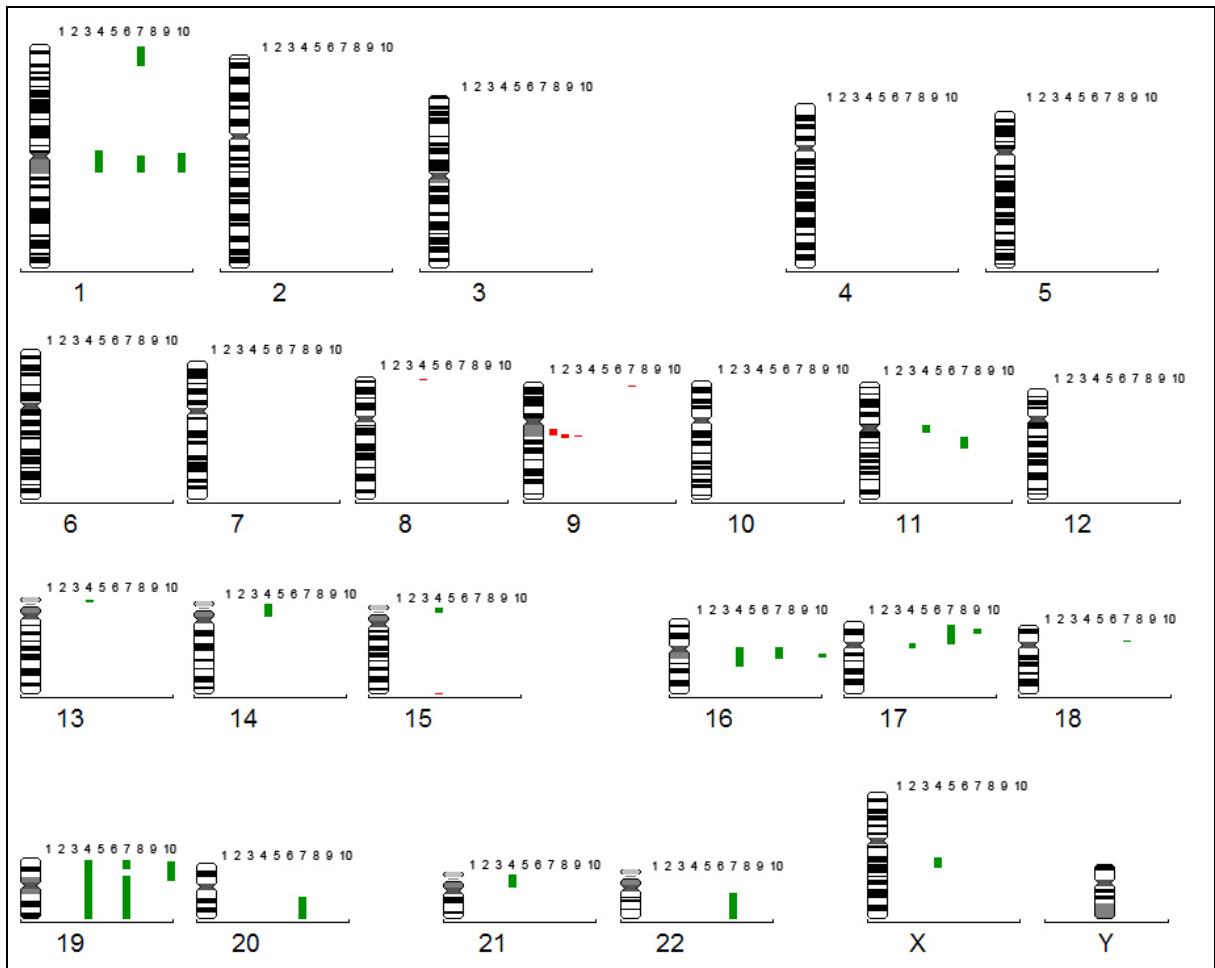


Figure 1: Chromosomal aberrations detected by CGH in the group of 10 ectopic tissue samples. Losses in red and gains in green.

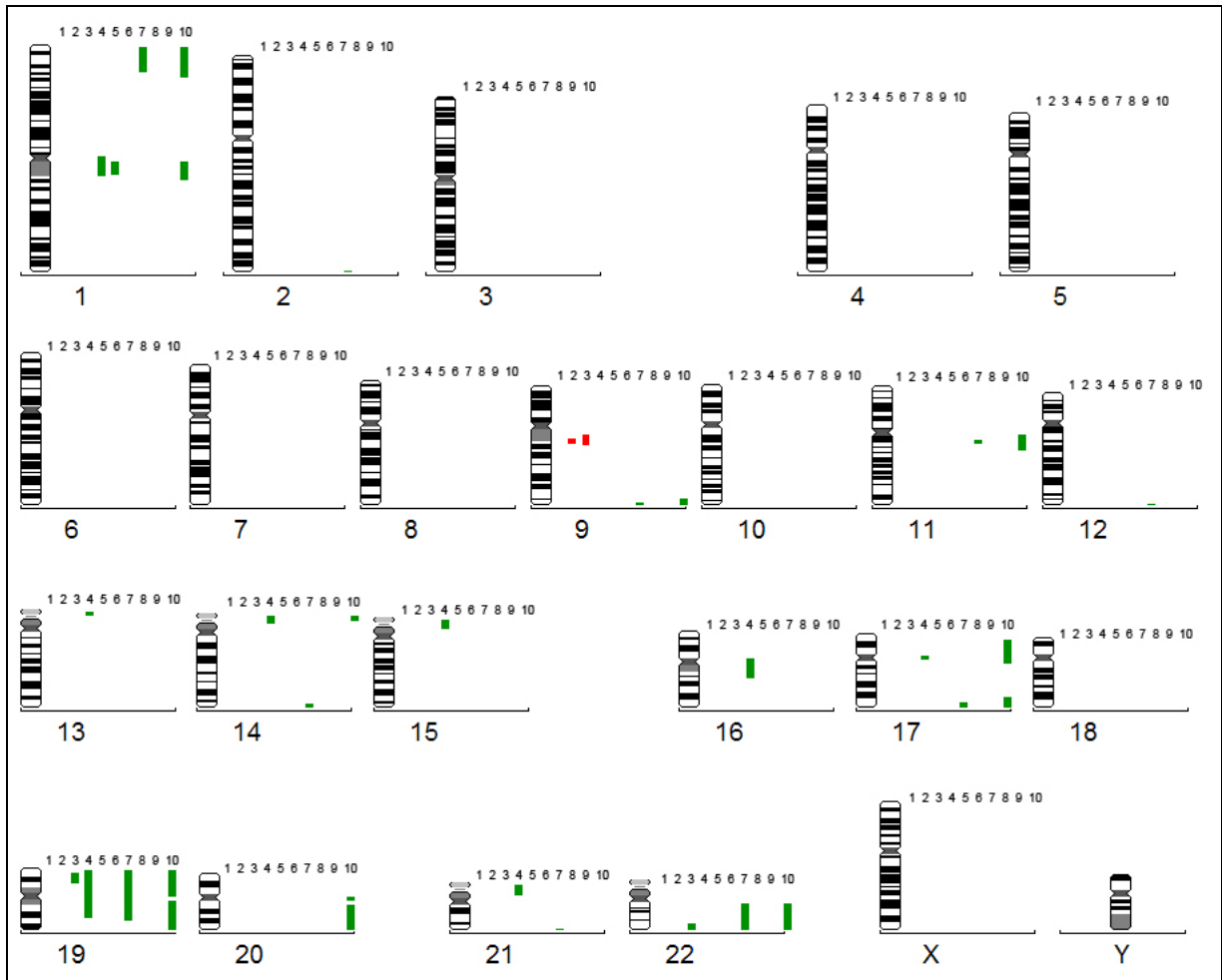


Figure 2: Chromosomal aberrations detected by CGH in the group of 10 euploid tissue samples from the endometriosis patients. Losses in red and gains in green.