

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Francielle Marques Araujo

“Análise da expressão diferencial dos genes *ID2*, *PRELP* e *SMOC2*
em endométrio ectópico e eutópico de mulheres com e sem
endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual”

Ribeirão Preto

2011

Francielle Marques Araujo

“Análise da expressão diferencial dos genes *ID2*, *PRELP* e *SMOC2*
em endométrio ectópico e eutópico de mulheres com e sem
endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual”

Tese apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto como pré-requisito
para obtenção do Título de Doutor em Biologia da Reprodução.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Alberto Nogueira

Ribeirão Preto

2011

FICHA CATALOGRÁIFCA

Araujo, Francielle Marques.

Análise da expressão diferencial dos genes *ID2*, *PRELP* e *SMOC2* em endométrio ectópico e eutópico de mulheres com e sem endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual / Francielle Marques Araujo; Orientador Prof Dr Antônio Alberto Nogueira. Ribeirão Preto, 2011.

94p. il.; 30cm

Tese (Doutorado – Programa de Pós-graduação em Biologia da Reprodução), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Nogueira, Antônio Alberto

FOLHA DE APROVAÇÃO

Francielle Marques Araujo

Análise da expressão diferencial dos genes *ID2*, *PRELP* e *SMOC2* em endométrio ectópico e eutópico de mulheres com e sem endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Aprovada em ____ / ____ / ____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

"Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei,
Ou nada sei

...

Penso que cumprir a vida
Seja simplesmente
Compreender a marcha
E ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro
Levando a boiada
Eu vou tocando os dias
Pela longa estrada, eu vou
Estrada eu sou

...

Todo mundo ama um dia,
Todo mundo chora
Um dia a gente chega
E no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz
..."

(Tocando em Frente - Almir Sater)

Dedico...
à minha Mãe Maria José
(in memoriam),
Mestre e Doutora na matéria VIDA!

AGRADEÇO

A **DEUS**, 'por deixar apenas um par de pegadas na areia...'

Ao Prof. Dr. Antônio Alberto Nogueira, pela orientação e confiança em mim acima de tudo.

Aos membros da banca pela disponibilidade e sugestões importantes.

Ao Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani e Dr. Júlio César Rosa e Silva pelas amostras cedidas, atenção, sugestões e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone pelo suporte técnico.

À Profa Dra Claudia Cristina Paro de Paz pela análise estatística e agradável convivência.

Aos professores do Bloco C do Departamento de Genética da FMRP-USP: Profa Dra Ester Silveira Ramos pelos ensinamentos científicos, Profa Dra Lúcia Regina Martelli pelo apoio e ao Prof. Dr. Raysildo Barbosa Lôbo pela convivência agradável.

Ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP.

Ao Departamento de Genética da FMRP-USP.

À amiga Juliana Meola pelas idéias, discussões e apoio incondicional.

A todos os amigos, técnicos e funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP pelo incentivo e ajuda profissional e pessoal na realização deste trabalho.

Aos amigos, técnicos e funcionários do Bloco C do Departamento de Genética da FMRP-USP pelo carinho, amizade sincera e convivência sempre alegre.

Em especial às amigas Fernanda P. Elias, Lisandra Cristina C. Silva, Patrícia Fonseca, por estarem sempre ali para me ouvir...

Às amigas Elda Silveira, Maralina A. Carvallho, Paula Cristina Nogueira, Paula L. Takeuchi, Raquel Dully, Simoni Valim pela torcida e momentos de descontração.

Ao meu pai Vicente e aos meus irmãos Jefferson e Gisele, os responsáveis por cada etapa alcançada na minha vida. A quem devo tudo que sou. Meu porto seguro. Minha força para continuar. Minha inspiração. Amo vocês!

Aos meus familiares que sempre torceram por mim.

Ao meu Amor, Laner, que mesmo distante sempre esteve presente com paciência, compreensão, companheirismo e palavras de força. Obrigada por estar na minha vida, me fazendo crescer e acreditar cada vez mais em mim.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) e à Fundação de Amparo ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP (FAEPA) pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

A todos que participaram de uma forma ou de outra para a realização desta pesquisa, contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal.

RESUMO

ARAÚJO, F. M. **Análise da expressão diferencial dos genes *ID2*, *PRELP* e *SMOC2* em endométrio ectópico e eutópico de mulheres com e sem endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual.** 2011. 94p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Endometriose é uma doença de etiopatogenia complexa e multifatorial, caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina principalmente no peritônio pélvico e ovários, envolvendo predisposição genética, fatores ambientais, anatômicos, endócrinos e alterações imunológicas. Afeta 10 a 15 % das mulheres em idade reprodutiva e 35 a 50% das mulheres com infertilidade, dor pélvica ou ambos. Apesar de ser uma das doenças mais estudadas em ginecologia, sua etiologia ainda não está clara e várias são as teorias para explicá-la. O estudo de genes que regulam de alguma forma os processos envolvidos com a endometriose como o *ID2* (proliferação celular), *PRELP* (matriz extracelular) e *SMOC2* (angiogênese) pode ajudar a esclarecer o desenvolvimento da mesma. O objetivo desse trabalho foi analisar a expressão gênica destes genes em amostras teciduais pareadas de 20 mulheres, sendo 10 de endométrio eutópico e lesões endometrióticas peritoneais e 10 de endométrio eutópico e endometrioma ovariano com idade entre 18 e 40 anos e em 10 amostras de endométrio de mulheres sem endometriose (controle), padronizadas de acordo com a fase do ciclo menstrual em fase proliferativa. O estudo foi realizado através de técnicas de Biologia Molecular como a Transcrição Reversa (RT-PCR) e análise quantitativa da expressão gênica (PCR em tempo real). A análise estatística mostrou que não houve diferença na expressão gênica entre o endométrio de mulheres sem endometriose e o endométrio eutópico de mulheres com endometriose. O gene *ID2* foi mais expresso na fase avançada da endometriose quando comparada a inicial e no endometrioma ovariano quando comparado ao endométrio eutópico de mulheres com endometriose e o *PRELP* na lesão peritoneal quando comparado ao endométrio eutópico de mulheres com endometriose. Nas análises realizadas com todas as lesões endometrióticas juntas, o *SMOC2* foi mais expresso na lesão (peritônio e ovário) quando comparado ao endométrio eutópico de mulheres com endometriose. Os resultados citados demonstram que a expressão dos genes estudados pode sofrer influência do meio peritoneal, podendo ser alterada dependendo do local da implantação (ovário ou peritônio).

Palavras-chaves: endometriose, expressão gênica, *ID2*, *PRELP*, *SMOC2* e PCR em tempo real.

ABSTRACT

ARAÚJO, F. M.. **Differential expression analysis of *ID2*, *PRELP* and *SMOC2* genes in ectopic and eutopic endometrium in women with and without endometriosis in the proliferative phase of the menstrual cycle.** 2011. 94p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Endometriosis is a complex disease and its etiology is multifactorial, characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity especially in the pelvic peritoneum and ovaries, involving genetic predisposition, environmental factors, anatomical, endocrine and immunological changes. It affects 10 to 15% of women of reproductive age and 35 to 50% of women with infertility, pelvic pain or both. Despite being one of the most studied diseases in gynecology, its etiology remains unclear and there are several current theories to explain it. The study of genes that regulate the processes involved somehow with endometriosis as *ID2* (cell proliferation), *PRELP* (extracellular matrix) and *SMOC2* (angiogenesis) may help clarify its development. The aim of this study was to analyze the gene expression of these genes in tissue samples from 20 women paired with 10 endometrial tissue and 10 peritoneal endometriotic lesions 10 endometrial tissue and 10 ovarian endometriotic lesions in proliferative phase of the menstrual cycle. Sixteen samples of endometrium of women without endometriosis, in the same phase of the menstrual cycle were collected to control (C). The study was conducted through molecular biology techniques such as reverse transcription (RT-PCR) and quantitative gene expression analysis (real-time-time PCR). Statistical analysis showed no difference in gene expression between the endometrium of women without endometriosis and endometrium from women with endometriosis. Showed a greater expression of the *ID2* gene in advanced stage of endometriosis when compared to the initial stage and ovarian endometrioma compared to eutopic endometrium of women with endometriosis and *PRELP* in peritoneal lesion compared to eutopic endometrium of women with endometriosis. In the analysis performed with all lesions the *SMOC2* was expressed more in the lesions (ovarian and peritoneal) compared to the eutopic endometrium of women with endometriosis. The results cited show that the expression of the genes studied may be influenced through the peritoneal cavity, and may be modified depending on the implantation site (ovary or peritoneum).

KEYWORDS: endometriosis, gene expression, *ID2*, *PRELP*, *SMOC2* and real-time PCR.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Análise da expressão do gene *ID2* entre o estadio I + II (fase inicial) x estadio III + IV (fase avançada)..... 37

Gráfico 2 – Análise da expressão do gene *SMOC2* entre endométrio eutópico de mulheres com endometriose e endométrio ectópico de mulheres com endometriose 38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Análise da expressão dos genes *ID2*, *PRELP* e *SMOC2* entre endométrio de mulheres sem endometriose com endométrio eutópico de mulheres com endometriose..... 36

Figura 2 – Análise da expressão dos genes *ID2* e *PRELP* entre endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS

bHLH – basic helix-loop-helix

cDNA – ácido desoxiribonucleico complementar

CONEP - Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

DNA - ácido desoxiribonucleico

dNTP - desoxinucleotideo trifosfato

EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético

FGF – fibroblast growth factor

HCFMRP- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HLH – helix-loop-helix

ID2 – inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein

ILK – integrin linked kinase

LRR – leucine-rich repeat

Kb – kilobase

KH₂PO₄ – fosfato de potássio monobásico

Mgcl₂ – cloreto de magnésio

NaCl – cloreto de sódio

Na₂HPO₄ – fosfato de sódio monobásico

p16 – proteína p16

p – braço curto do cromossomo

pb – pares de bases

PBS – phosphate-buffered saline

PDGF – platelet-derived growth factor

pRb – proteína do gene retinoblastoma

PRELP – proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein

PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PROC FREQ – estatística de frequência

q – braço longo do cromossomo

RNA – ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

SMAP - *smooth muscle associated protein 2*

SMOC2 – SPARC related modular calcium binding 2

SNP – polimorfismo nucleotídico individual

SPARC – secreted protein, acidic, cysteine-rich

SRLP – small LRR proteoglycans

USP - Universidade de São Paulo

VEGF – vascular endothelial growth factor

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

g/L – grama por litro

µg – micrograma

mg – miligrama

µL – microlitro

mL – mililitro

M – molar

mM – milimolar

nm - nanomolar

% - porcentagem

U - unidade

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1-INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 Endometriose | 17 |
| 1.2 Etiologia da endometriose..... | 18 |
| 1.3 Genética e endometriose | 19 |
| 1.4. O gene <i>ID2</i> [(<i>inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein</i>)] | 22 |
| 1.5. O gene <i>PRELP</i> [(<i>proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein</i>)] | 24 |
| 1.6. O gene <i>SMOC2</i> [(<i>SPARC related modular calcium binding 2</i>)]..... | 25 |
| 2 - OBJETIVO | 28 |
| 3 – CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| 3.1. Aspectos Éticos do Projeto | 31 |
| 3.2. Casuística | 31 |
| 3.3. Amostras | 32 |
| 3.4. Extração do RNA total..... | 32 |
| 3.5. Síntese do cDNA | 32 |
| 3.6. Quantificação por PCR em Tempos Real | 33 |
| 3.7. Análise Estatística dos resultados | 33 |
| 4 - RESULTADOS..... | 35 |
| 5 - DISCUSSÃO | 39 |
| 6 - CONCLUSÃO | 45 |
| BIBLIOGRAFIA | 47 |
| ANEXO..... | 60 |
| APÊNDICES | 62 |
| MANUSCRITO | 66 |

1-INTRODUÇÃO

1.1 Endometriose

Endometriose é uma doença de etiopatogenia complexa e multifatorial, envolvendo predisposição genética, fatores ambientais, anatômicos, endócrinos e alterações imunológica. Muitas vezes é progressiva, caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina - principalmente no peritônio pélvico e ovários, levando á processos inflamatórios, reação cicatricial e formação de aderências, associados à infertilidade e dor pélvica crônica. É uma patologia comum, de caráter benigno, estrógeno-dependente, que afeta de 10 a 15 % das mulheres em idade reprodutiva, 35 a 50% das mulheres com infertilidade, dor pélvica ou ambos (Cramer e Missmer, 2002; Giudice e Kao, 2004).

Acredita-se primariamente que a endometriose ocorra devido à menstruação retrógada e implante de células endometriais na cavidade abdominal (Sampson, 1927). Entretanto, apesar da menstruação retrógada ocorrer na maioria das mulheres, a endometriose se desenvolve somente em 10% delas (Eskenazi e Warner, 1997), favorecendo a hipótese de etiopatogenia multifatorial da doença.

É comum encontrarmos implantes endometrióticos na cavidade pélvica, principalmente localizado no peritônio pélvico e ovário. Entretanto, também podem ser encontrados no septo reto-vaginal, pericárdio, pleura, fígado, rim, bexiga, cérebro e raramente em homens (Giudice e Kao, 2004).

Embora a história e exame clínicos possam sugerir um diagnóstico presuntivo de endometriose o diagnóstico definitivo é cirúrgico, através da laparoscopia ou laparotomia. Assim, a laparoscopia, apesar de onerosa e invasiva, é ainda o método mais confiável e o padrão “ouro” para o diagnóstico da doença. Na maioria dos casos, a endometriose é cirurgicamente estadiada com base na localização, extensão e tipo de lesão por laparoscopia (Brosens et al., 2004). A *American Society for Reproductive Medicine* (1997), organizou e propôs a classificação da endometriose em quatro estadios: forma mínima (estádio I), leve

(II), moderada (III) e severa (IV). Além desta classificação, morfologicamente os implantes podem ser bastante variáveis, ter múltiplas formas e colorações, e em geral, observam-se lesões de cor vermelha, amarela, marrom ou preta (American Society for Reproductive Medicine, 1997; Kamergorodsky et al., 2007).

1.2 Etiologia da endometriose

A etiologia da endometriose envolve fatores que influenciam no seu estabelecimento e progressão, incluindo hormonais (Nyholt et al., 2009), imunes (Weiss et al., 2009), alterações ambientais (Guo, 2009) e predisposição genética (Juo et al., 2006) e apesar de ser uma das doenças mais estudadas em ginecologia, sua etiologia ainda não está clara e várias são as teorias para explicá-la (Ulukus et al., 2009; Carvalho et al., 2011).

A mais aceita é a teoria de Sampson ou fluxo menstrual retrógrado (1927), que aponta a presença de células endometriais viáveis no fluxo menstrual retrógrado como causador das lesões. No entanto, praticamente 90% das mulheres com tubas pèrvias apresentam fluxo menstrual retrógrado e a maioria não apresentará a endometriose (Halme et al., 1984). Descrita por Meyer, em 1919, a teoria da metaplasia celômica, sugere que o epitélio celômico possa se transformar, por metaplasia, em tecido tipo endométrio (Witz, 2003). E a teoria imunológica, que se baseia no conceito que a menstruação retrógada é um fenômeno universal nas mulheres e nem todas desenvolvem endometriose. Assim, a implantação dos focos endometrióticos seria resultado de falha na limpeza destas células, decorrentes de anormalidades na função imunológica (Viganò et al., 1991; Oosterlynck et al., 1991). Hoje se acredita na confluência destas teorias para a explicação da etiopatogenia da endometriose peritoneal e ovariana. Haveria realmente fluxo menstrual retrógrado associado à predisposição imunológica no microambiente peritoneal que facilitaria o implante de células endometriais viáveis e com potencial para implantação?

Estudos sugerem que a endometriose esteja associada a um processo inflamatório pélvico, ocasionado pelos implantes endometriais ectópicos (Lebovic et al., 2001; Lima et al., 2006) que sofrem sangramento cíclicos (Arya e Shaw, 2005) ocasionando disfunção de células do sistema imunológico e número aumentado de macrófagos ativados no fluido peritoneal, os quais secretam vários fatores locais tais como fatores de crescimento e citocinas (Lima et al., 2006).

Assim, o desenvolvimento da endometriose parece ser um fenômeno complexo, facilitado por fatores múltiplos, incluindo: quantidade e qualidade de células endometriais no fluido peritoneal, atividade inflamatória, expressão aumentada de moléculas de adesão, angiogênese, apoptose reduzida, escape do sistema imunológico e aumento da proliferação celular (Lima et al., 2006; Ulukus et al., 2006).

1.3 Genética e endometriose

Endometriose tem sido comparativamente similar a doenças malignas do sistema reprodutivo em termos de predisposição familiar, possibilidade de alcançar órgãos distantes, alterações genéticas identificadas em tecidos e a existência de um ambiente imunobiológico, angiogênico e hormonal alterado (Nezhat et al., 2008). Alguns estudos populacionais tem demonstrado que mulheres diagnosticadas com endometriose tem um aumento estatisticamente significativo no risco de desenvolver vários tipos de câncer (Brinton et al., 1997; Olson et al., 2002; Melin et al., 2006).

A genética da endometriose é complexa, no entanto, acredita-se que ela é herdada de um modo poligênico/multifatorial e há predisposição familiar para o seu desenvolvimento. Endometriose que ocorre familiarmente tende a ser mais severa quando comparada a casos esporádicos. Isto sugere que há mais propensão genética em indivíduos com doença grave (Kennedy, 1996).

Estudos moleculares tem focado esforços consideráveis na expressão, regulação e herança de genes na endometriose. Um grande número de genes candidatos tem sido avaliado para sua associação com endometriose, como os genes envolvidos na inflamação, na síntese de esteróide, na desintoxicação, no metabolismo de estrógeno, na apoptose, na regulação do ciclo celular, além de fatores de crescimento, moléculas de adesão, receptores de hormônios, oncogenes e sistemas metabólicos (Hansen e Eyster, 2010).

Dentre as técnicas utilizadas para o estudo da endometriose, a tecnologia do microarray cDNA é uma poderosa ferramenta para quantificar níveis de expressão de centenas de genes simultaneamente. Com esta técnica, pode-se comparar modelos de expressão gênica entre endométrio eutópico e ectópico da mesma paciente ou identificar genes diferencialmente expressos no endométrio entre amostras com e sem endometriose (Eyster et al., 2007). Na literatura, há alguns trabalhos com análise comparativa global da expressão gênica de tecido endometrial de mulheres com e sem endometriose (Matsuzaki et al., 2004; Wu et al., 2006; Eyster et al., 2007; Sherwin et al., 2008) . Estes estudos diferem principalmente na localização do tecido endometrial analisado (eutópico ou ectópico), na plataforma de microarray utilizada e na fase do ciclo menstrual que a amostra foi obtida (Aghajanova; Velarde e Giudice, 2010). Mettler et al. (2007), utilizaram a técnica de microarray para analisar a expressão gênica de 1176 genes em tecido endometriótico ovariano de 5 pacientes e compará-la ao endométrio de 5 mulheres sem endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual. O resultado da análise demonstrou que 13 genes estavam diferencialmente expressos.

Nos últimos anos, tem sido mostrado que pequenos microRNAs “*non-coding*” (miRNAs) são importantes componentes de uma complexa rede de genes regulatórios (Reinhart e Bartel 2002; Aravin et al., 2007). Estudos recentes mostram que os miRNAs e seus alvos, os mRNAs, são diferencialmente expressos na endometriose e em outras doenças

do sistema reprodutor feminino (Pan et al., 2007; Burney et al., 2009; Ohlsson Teague et al., 2009; Filigheddu et al., 2010; Ramón et al., 2011). Sabe-se que os miRNAs controlam um amplo espectro de funções celulares normais e patológicas, tendo um importante papel na patogênese destas doenças e possivelmente possam ser usados como biomarcadores e ferramenta terapêutica na endometriose (Ohlsson Teague et al., 2010). Além disso, vários trabalhos tem focado nas diferenças da expressão gênica entre lesão endometriótica e endométrio eutópico. Há também diferenças conhecidas em expressão gênica no endométrio eutópico de mulheres com endometriose comparada com endométrio controle de mulheres sem a doença (Burney et al., 2007). Não é conhecido, entretanto, se a expressão gênica alterada no endométrio eutópico é devido a alguma diferença inerente a expressão gênica entre pacientes e controles, ou alternativamente, se a existência de lesões endometrióticas gera um ambiente peritoneal alterado que age no endométrio eutópico resultando em expressão gênica aberrante (Pelch et al., 2010). Assim estudos comparativos entre o endométrio de mulheres sem endometriose (controle) e o endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose podem esclarecer alterações precoces e necessárias ao desenvolvimento da doença.

O estudo de genes que regulam de alguma forma os processos acima poderiam ajudar a esclarecer o desenvolvimento da endometriose. Os genes *ID2*, *PRELP* e *SMOC2* fazem parte de uma lista de genes desregulados e previamente estudados pelo nosso grupo (Meola et al., 2010) e que podem estar envolvidos no processo da etiopatogenia da doença. A busca incessante por mecanismos relacionados à expressão de genes presentes em comportamentos biológicos envolvidos com a etiopatogenia da doença poderá, futuramente, indicar marcadores moleculares, permitindo um diagnóstico menos invasivo e com possíveis aplicações terapêuticas.

1.4. O gene *ID2* (*inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein*)

O gene *ID2* está mapeado na região 2p25 (Mathew et al., 1995) e sua proteína interage com os componentes do ciclo celular normalmente envolvidos nos mecanismos regulatórios da progressão do ciclo, como por exemplo: pRb, p16. Sua superexpressão parece tornar células cancerosas imunes aos efeitos de inibição do crescimento de várias proteínas supressoras de tumor (Lasorella, Iavarone e Israel, 1996).

A proteína *ID2* pertence a uma família de 4 proteínas (*ID 1, 2, 3 e 4*) relacionadas ao controle da diferenciação e progressão do ciclo celular em vários organismos, desde moscas até o homem (Pesce and Benezra, 1993; Chen and Lim, 1997; Langlands et al., 1997; Yates et al., 1999).

Todas as quatro proteínas *ID* pertencem a uma classe de fatores de transcrição conhecida como proteínas hélice-alça-hélice (*HLH – helix-loop-helix*), que são uma grande família de proteínas, principalmente ativadores transcricionais, que compartilham um motivo de ligação comum, composto de uma região de amino ácido básico e uma região hélice-alça-hélice (*bHLH*) (Benezra et al., 1990; Norton et al., 1998). As proteínas *bHLH* formam homo e heterodímeros através das regiões hélice-alça-hélice e se ligam a sequencias específicas de DNA por meio das regiões básicas (Davis et al., 1990; Voronova e Baltimore, 1990).

A descoberta da proteína *ID* mostrou uma nova perspectiva para considerar a regulação das proteínas *bHLH* (Benezra et al., 1990). As proteínas *ID* contem uma região *HLH* similar aquela das proteínas *bHLH* e podem formar heterodímeros com algumas delas. Mas estes heterodímeros não podem se ligar ao DNA, porque a proteína *ID* perde a região básica responsável por esta ligação. Portanto, a proteína *ID* regula negativamente a capacidade de ligação ao DNA das proteínas *bHLH* que controlam a expressão gênica de um tipo celular específico e a expressão dos genes que controlam o ciclo celular (Lassar et al., 1994).

Vários processos celulares são regulados por proteínas ID: inibição da diferenciação celular por interferência, extensão da vida celular (Alani et al., 1999; Nickoloff et al., 2000; Tang et al., 2002), regulação da angiogênese (Lyden et al., 2001), desenvolvimento cardíaco (Fraidenaich et al., 2004) e manutenção do fenótipo da célula tronco embrionária (Ying et al., 2003).

A expressão de proteínas ID é anormal em muitos tumores, incluindo câncer pancreático (Maruyama et al., 1999), câncer cervical (Schindl et al., 2001), melanoma (Polsky et al., 2001), carcinoma de células escamosas do esôfago (Hu et al., 2001) e no câncer de tireóide (Kebebew, 2005). Em alguns tumores sua expressão está associada com prognóstico clínico ruim como no câncer de ovário, cervical, de próstata e no câncer de mama (Schindl et al., 2001; Schoppmann et al., 2003; Maw et al., 2008). Em conjunto, estes dados sugerem um papel oncogênico para as proteínas ID (Manthey et al., 2010). Estas tem sido implicadas em diferentes passos na tumorigenese, diferenciação e metástase (Benezra, Rafii e Lyden, 2001; Fong, Debs e Desprez, 2004; Hasskarl e Munger, 2002; Sikder et al., 2004). A re-expressão destas proteínas, que são marcadores fetais, em células tumorais e estroma do tumor indica a reversão de um estado “anterior”, semelhante ao embrionário em que o potencial de proliferação e migração da célula e a rápida aquisição de suporte dos vasos sanguíneos facilitam o processo de transformação nas doenças humanas (Perk, Iavarone e Benezra, 2005).

A endometriose exhibe alguns aspectos de malignidade tais como aumento de crescimento, vascularização e invasão tecidual, mas características tumorais como expansão monoclonal e anomalias genéticas permanecem indefinidas (Viganò et al., 2006). Visto as similaridades entre endometriose e câncer, a mudança na expressão de genes associados com adesão celular, glicolização de proteínas, invasão celular e angiogênese talvez esteja envolvida na patologia da endometriose como estão no câncer (Eyster et al., 2007).

1.5. O gene *PRELP* [(proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein)]

Em humanos, o gene *PRELP* está mapeado no cromossomo 1q32 sendo codificado por três éxons (Grover et al., 1996). Tal gene codifica a proteína prolargina que é rica em leucina e apresenta uma região amino-terminal rica em resíduos de prolina e arginina (Bengtsson et al., 1995; Bengtsson et al., 2002). Originalmente, foi identificada como uma abundante proteína na matriz extracelular da cartilagem de bovinos funcionando como uma molécula de ligação da membrana basal ao tecido conjuntivo subjacente (Heinegård et al., 1986; Grover et al. 1996). Em humanos, uma das principais características desta proteína é sua localização relativamente restrita aos tecidos cartilagosos, onde sua expressão é abundante no adulto e deficiente no feto e recém-nascido (Melching e Roughley, 1990; Grover et al., 1996). Além da cartilagem, a expressão do *PRELP* foi encontrada em outros tecidos tais como rim, pele e tendão (Heinegard et al., 1986). A função do *PRELP* ainda não está totalmente elucidada e, portanto não está claro porque ele deve exibir uma distribuição restrita ao tecido, ou porque ele não deve ser necessário na cartilagem antes do nascimento (Bengtsson et al., 2000).

O gene *PRELP* pertence a uma família de proteínas de repetição rica em leucina (LRR – *leucine-reach repeat*) (Kobe e Deisenhofer, 1994), que são caracterizadas por uma série de motivos ricos em leucina adjacentes (LXXLXLXXNXL) cercados por domínios ligados a disulfeto. As LRR dos tecidos conectivos provavelmente agem na regulação da montagem da matriz e fornecem ligações entre as principais estruturas constituintes (Iozzo, 1997; Hocking, Shinomura e McQuillan, 1998). Várias das proteínas LRR (biglican, decorin, lumican e fibromodulin) ligam-se ao colágeno e interferem na formação de fibrila (Vogel, Paulsson e Heinegard, 1984; Bidanset et al., 1992; Hedbomm e Heinegard, 1993).

A presença de 10 repetições centrais ricas em leucina coloca a *PRELP* na mesma subfamília das pequenas proteoglicanas ricas em leucina (SLRPs – *small LRR proteoglycans*) – decorin, biglican, fibromodulin, lumican e keratocan (Iozzo e Murdoch, 1996; Hocking et al.,

1998). O envolvimento dos membros desta família na fibrilogênese do colágeno, crescimento celular, diferenciação e migração revelam sua importância na modelagem da matriz extracelular (Tasheva, Klocke e Conrad, 2004).

A maior diferença estrutural entre os membros da sub-família está na região amino terminal das suas proteínas do núcleo, onde decorin e biglican são substituídas por condroitino-sulfato ou dermatan-sulfato, no entanto, o mesmo não ocorre com PRELP, fibromodulin, lumican e keratocan. É nesta região que PRELP é rica em prolina e resíduos de arginina. PRELP, entretanto, é a única que tem um domínio de base amino-terminal rico em arginina e resíduos de prolina (Bengtsson et al., 1995). Estes resíduos, provavelmente, dão à região uma ampla estrutura e os grupos de resíduos de arginina na região amino-terminal, talvez sejam um sítio de ligação à heparina (Cardin e Weintraub, 1989).

Baseado nesta estrutura, PRELP talvez funcione como uma molécula de ligação na matriz, interagindo com outras proteínas da matriz extracelular através dos seus LRRs e com glicosaminoglicanos através de seu domínio amino-terminal. Desde que muitas células contem sulfato de heparina na sua superfície, PRELP pode ligar as células à matriz. A localização de PRELP na cartilagem e sua capacidade de se ligar a célula corroboram com esta hipótese (Heinegard et al., 1986; Sommarin e Heinegard, 1989).

1.6. O gene *SMOC2* [(*SPARC related modular calcium binding 2*)]

O gene *SMOC2* humano foi descrito, em 2002, com o nome de *Smcp2* (*smooth muscle associated protein 2*) associado com músculo liso e super expresso durante a formação da neointima em rato (Nishimoto et al., 2002). Sua estrutura foi elucidada por análise de um *contig* (sequências sobrepostas de DNA) (NT 007302) originária de uma sequência do cromossomo 6. Este gene está mapeado no 6q27 e abrange cerca de 226kb. Sua região

codificadora consiste de 13 éxons. Cada domínio do *SMOC2* é codificado por um ou mais éxons e os limites do domínio coincidem com locais de *splicing* (Vannahme *et al.*, 2003).

Este gene é expresso principalmente na matriz extracelular e codifica a proteína matricelular *SMOC2* que pertence à família da proteína *SPARC* (*secreted protein, acidic, cysteine-rich*), altamente expressa durante a embriogênese e na cicatrização (Sage *et al.*, 2003; Vannahme *et al.*, 2003; Rocnik *et al.*, 2006; Maier *et al.*, 2008). Também fazem parte desta família *SPARCL1* (*SPARC-like1, SC1/hevin*), *FSTL1* (*Follistatin-like 1, TSC-36*), *SPOCK1*, *SPOCK2*, e *SPOCK3* (*Sparc/osteonectin, cwcv, and kazallike domains proteoglycan 1-3, testican1-3*). Proteínas matricelulares influenciam uma variedade de funções celulares incluindo sinalização de fator de crescimento, migração, adesão, cicatrização, angiogênese e proliferação celular (Bornstein e Sage, 2002).

SMOC2 é expresso em quase todos os tecidos, sendo mais abundante no coração, músculo liso, baço e ovário (Vannahme *et al.*, 2003). A proteína *SMOC2* promove a montagem da matriz e pode estimular a proliferação e a migração de células endoteliais, bem como atividade de angiogênese. Estes efeitos biológicos resultam de interações entre fatores matricelulares e de crescimento, integrinas e/ou outras proteínas da matriz extracelular (Sage *et al.*, 2003; Rocnik *et al.*, 2006).

Estudos *in vitro* mostram que *SMOC2* interage com integrinas $\alpha\beta1$ e $\alpha\beta6$ (Maier *et al.*, 2008) e mantém a integrina ligada a quinase (ILK – *integrin linked kinase*) ativa durante a fase G1 do ciclo celular, contribuindo para a progressão do mesmo. Consistente com o papel para *SMOC2* no controle do crescimento, ativação de ILK e expressão de ciclina D1 são dependentes de *SMOC2* (Liu *et al.*, 2008). Estudos de perfil de SNP (single-nucleotide polymorphism) tem identificado polimorfismos para o *SMOC2* ligados a função pulmonar indicando um possível papel para este gene no crescimento normal e desenvolvimento (Wilk *et al.*, 2007).

Estes dados sugerem que *SMOC2* pode mediar a interação entre integrinas e a matriz extracelular e contribuir para sinalização do seu efector intracelular, ILK. Outros ensaios mostram que *SMOC2* media os efeitos mitogênicos e angiogênicos de VEGF (*vascular endothelial growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) e FGF (*fibroblast growth factor*), sugerindo assim que *SMOC2* pode mediar interações entre estes fatores de crescimento e seus receptores, ou agir em paralelo, via sinérgica (Rocnik *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008).

A análise da expressão dos genes aqui apresentados ainda não foi realizada através da técnica de PCR em tempo real em lesões endometrióticas, bem como em endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual. A proliferação das células endometrióticas deve ocorrer para que as mesmas cresçam e se estabilizem, entretanto, não está claro se há diferenças na proliferação entre lesões endometrióticas e tecido eutópico (Wingfield *et al.*, 1995; Jurgensen *et al.*, 1996; Nisolle, Casanas-Roux e Donnez, 1997).

Estudos comparativos da expressão gênica entre o endométrio de mulheres sem endometriose (controle) e o endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose são importantes para identificar se o aumento da expressão gênica já está presente no endométrio dessas mulheres ou se essa expressão só é alterada quando este tecido cai na cavidade peritoneal e adquirir um potencial para se transformar em lesões endometrióticas.

2 - OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão dos genes *ID2*, *PRELP* e *SMOC2* em endométrio de mulheres sem endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual e compará-la a expressão gênica no endométrio eutópico e nas lesões de mulheres com endometriose na mesma fase do ciclo menstrual.

3 - CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos do Projeto

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, processo HCRP nº 2204/2010 e processo HCRP nº 9699/2006 (banco de tecidos de endometriose). Todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. As amostras de endométrio foram armazenadas em freezer a -80°C após tratamento com criopreservador *Tissue-Teck[®] O.C.T. Compound* (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA).

3.2. CASUÍSTICA

Neste estudo descritivo comparativo entre pacientes com e sem endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual, foram avaliadas amostras teciduais pareadas de 20 mulheres, sendo 10 de endométrio eutópico e lesões endometrióticas peritoneais e 10 de endométrio eutópico e endometrioma ovariano de mulheres com idade entre 18 e 40 anos, não menopausadas, sem uso de qualquer terapia hormonal há pelo menos seis meses antes da coleta, atendidas por infertilidade e/ou dor pélvica nos ambulatórios de dor pélvica crônica (AGDP) e Infertilidade Conjugal (AEST) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto - USP, submetidas à laparoscopia com diagnóstico laparoscópico e histológico de endometriose. O estadio da endometriose foi determinado de acordo com a classificação da *American Society for Reproductive Medicine* (American Society for Reproductive Medicine, 1997). Durante a laparoscopia foram colhidas biópsias de endométrio eutópico através de Cureta de Novak e amostras de lesões endometrióticas peritoniais e ovarianas.

O grupo controle foi formado por 16 amostras de endométrio de mulheres sem endometriose, padronizadas de acordo com a fase do ciclo menstrual em fase proliferativa, confirmado por critérios de datação histológica. Este grupo foi composto por pacientes com idade entre 18 e 40 anos, no menacme, que foram submetidas à laparoscopia para laqueadura

tubária pelo serviço de Endoscopia Ginecológica, com confirmação laparoscópica da ausência de lesões endometrióticas, que estavam sem uso de medicação hormonal há pelo menos seis meses antes da coleta. A biópsia endometrial foi colhida através de Cureta de Novak, durante o procedimento cirúrgico.

3.3. AMOSTRAS

As biópsias de endométrio eutópico e ectópico das pacientes com diagnóstico de endometriose foram coletadas por laparoscopia. Das 20 biópsias de endométrio ectópico 10 eram lesões peritoniais (seis vermelhas, quatro negras), sendo três em estágio I, quatro em estágio II, duas em estágio III e uma em estágio IV e 10 corresponderam a endometrioma ovariano quatro em estágio III e seis em estágio IV.

3.4. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

As amostras foram lavadas em solução de PBS (1x) (NaCl 8,50g/L; Na₂HPO₄ 1,11g/L; Na₂HPO₄.12H₂O 2,81g/L; KH₂PO₄ 0,20g/L pH7,0) para retirar o criopreservador dos tecidos. Em seguida, o RNA total (50mg de tecido) foi extraído com TRIZOL[®] Reagent (*Invitrogen Life Technologies*, Paisley, UK) de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de RNA total foram medidas em espectrofotômetro a densidade óptica de 260nm. O RNA permanece armazenado à -80⁰C para procedimentos posteriores.

3.5. SÍNTESE DO cDNA

Um micrograma de RNA total de cada amostra foi transcrito reversamente usando o *High Capacity cDNA Archive Kit* (*Applied Biosystems*, Warrington, UK) segundo as instruções do fabricante.

3.6. QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPOS REAL

As sondas e os *primers* para os genes *ID2* (Hs00747379_m1), *PRELP* (Hs00160431_m1), *SMOC2* (Hs00405777_m1) e para os genes de referência da reação *GAPDH* (*glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase*) (Hs99999905_m1) e *ACTB* (*actin, beta*) (Hs99999903_m1) foram obtidos usando *Assay-on-Demand™ Gene Expression Products* (*Applied Biosystems, Warrington, UK*), e as quantificações foram realizadas no aparelho *ABI PRISM™ 7500FAST Sequence Detection Systems* (*Applied Biosystems, Warrington, UK*). O nível de expressão relativo para os genes analisados foi calculado para cada amostra de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (ou 2-Ct), descrito previamente no *Applied Biosystems User Bulletin # 2* (PN 4303859) (*Applied Biosystems, Warrington, UK*). Um pool de cDNA das amostras controles foi utilizado como calibrador nas análises.

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

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As análises estatísticas foram realizadas no *software* SAS 2003 (2002-2003, *SAS Institute Inc., Cary, NC, USA*). Aplicamos o Teste Welch's ANOVA não pareado para comparar: [1] endométrio de mulheres sem endometriose com endométrio eutópico de mulheres com endometriose; [2] estádios das lesões de mulheres com endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual. Teste T pareado para comparar as médias de expressão dos genes obtidas entre: [3] endométrio eutópico e ectópico de 10 mulheres com endometriose

peritoneal na fase proliferativa do ciclo menstrual e 10 mulheres com endometriose ovariana na mesma fase do ciclo menstrual; [4] endométrio eutópico de mulheres com endometriose e endométrio ectópico de mulheres com endometriose (lesão peritoneal + endometrioma ovariano). Todos os testes foram realizados conforme os procedimentos GLM. Além disso, foram feitas análises de correlação de Spearman pelo PROC CORR entre os níveis de expressão gênica obtidos entre os três genes (*ID2*, *PRELP* e *SMOC2*). Análises com $P < 0,05$ foram consideradas significativas.

4 - RESULTADOS

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

Não houve diferença significativa entre a expressão dos genes *ID2*, *PRELP* e *SMOC2* no endométrio de mulheres sem endometriose quando comparado ao endométrio de mulheres com endometriose (Figura 1).

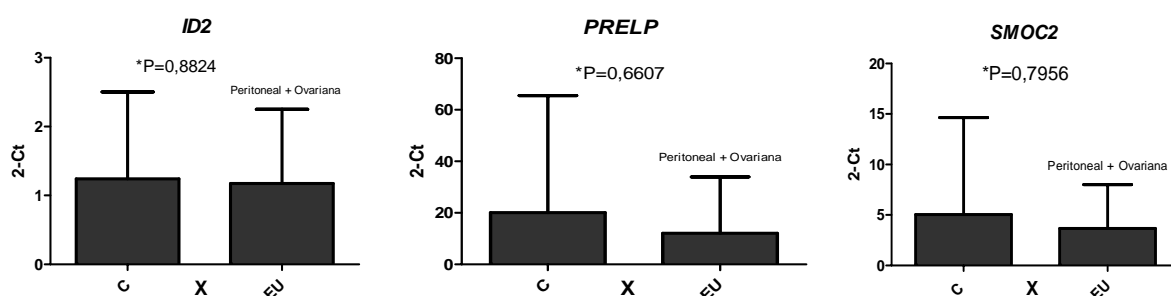


Figura 1 – Análise da expressão dos genes *ID2*, *PRELP* e *SMOC2* entre endométrio de mulheres sem endometriose com endométrio eutópico de mulheres com endometriose, sem diferença significativa para $P < 0,05$. $2-Ct = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ - quantificação relativa. C= endométrio de mulheres sem endometriose; EU= endométrio eutópico de mulheres com endometriose.

Nas amostras não-pareadas analisadas foi encontrada diferença significativa ($P < 0,05$) para o gene *ID2* na comparação entre estadio I + II (fase inicial) x estadio III + IV (fase avançada) (Gráfico 1).

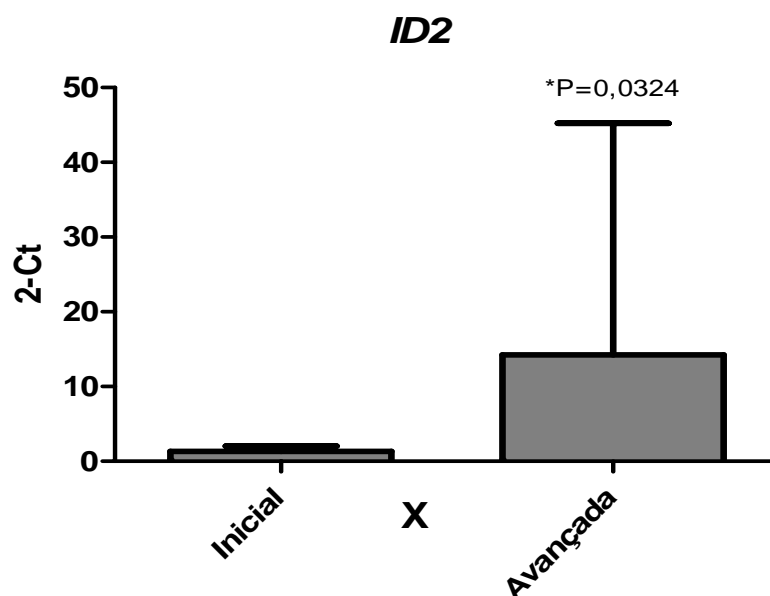


Gráfico 1 – Análise da expressão do gene *ID2* entre o estágio I + II (fase inicial) x estágio III + IV (fase avançada). $2-Ct = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ - método para quantificação relativa.

A análise das amostras pareadas resultou em uma maior expressão dos genes *ID2* e *PRELP*. O gene *ID2* foi mais expresso no endometrioma ovariano comparado ao endométrio eutópico de mulheres com endometrioma ovariano e o gene *PRELP* na lesão peritoneal comparada ao endométrio eutópico de mulheres com a lesão (Figura 2). O gene *SMOC2* mostrou uma maior expressão na análise entre endométrio eutópico de mulheres com endometriose e a lesão (peritoneal + endometrioma) (Gráfico 2).

Não foi encontrada diferença significativa na análise de correlação dos genes *PRELP* e *SMOC2* com estágio, sendo os valores de $P = 0,8491$ e $0,3345$, respectivamente. A correlação entre *ID2* x estágio foi significativa para $P < 0,05$ com $P = 0,0491$.

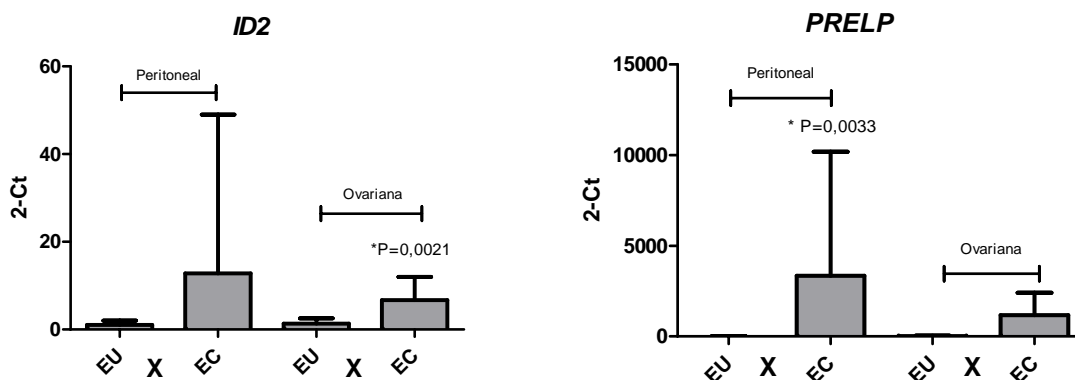


Figura 2– Análise da expressão dos genes *ID2* e *PRELP* entre endométrio eutópico de mulheres com endometriose e o endométrio ectópico. $2\text{-Ct} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ - método para quantificação relativa. EU= endométrio eutópico de mulheres com endometriose; EC= endométrio ectópico de mulheres com endometriose.

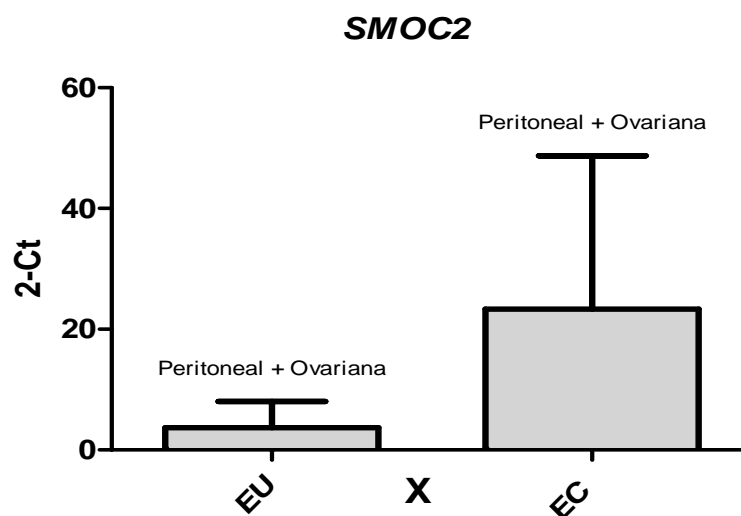


Gráfico 2 – Análise da expressão do gene *SMOC2* entre endométrio eutópico de mulheres com endometriose e o endométrio ectópico de mulheres com endometriose. $2\text{-Ct} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ - método para quantificação relativa. EU= endométrio eutópico de mulheres com endometriose; EC= endométrio ectópico de mulheres com endometriose.

5 - DISCUSSÃO

A análise da expressão gênica é fundamental para a pesquisa biológica, e a detecção da expressão diferencial de gene (s) entre diferentes tipos de tecido ou entre estado normal e a doença pode levar a novas terapêuticas para o tratamento da mesma. A técnica da PCR em tempo real é considerada a metodologia padrão para a quantificação da expressão gênica, ela permite a determinação exata dos níveis de expressão de genes alvos em células e tecidos (Thellin et al., 1999; Gorzelniak et al., 2001; Goodsaid et al., 2003).

Vários estudos moleculares têm sido realizados para elucidar o papel dos genes na etiologia da endometriose, no entanto, nenhum deles estudou a relação dos genes aqui apresentados com a endometriose utilizando a técnica da PCR em tempo real. Sabemos da importância desta análise, já que o comportamento dos genes no endométrio eutópico e ectópico de mulheres com e sem endometriose pode nos ajudar a entender a base biológica desta patologia.

Em um trabalho prévio do nosso grupo (Meola et al. 2010), observou-se, por meio de hibridação subtrativa, que os genes *ID2*, *PRELP* e *SMOC2* encontravam-se “*up-regulated*” quando comparada a expressão no endométrio ectópico com eutópico de mulheres com endometriose. Até o momento, não há outros trabalhos de *screening*, PCR em tempo real ou polimorfismos na literatura, relacionando o gene *ID2* com a endometriose. Pelch et al. (2010) induziram endometriose em camundongos e analisaram o perfil de expressão gênica empregando a técnica de microarray. A análise foi realizada 3 e 29 dias após a indução, e observou-se que o *SMOC2* foi “*down-regulated*” e o *PRELP* “*up-regulated*”, respectivamente nas lesões endometrióticas.

Não houve diferença significativa entre a expressão dos genes estudados no endométrio de mulheres sem endometriose com o endométrio eutópico de mulheres com endometriose, este resultado é uma evidência da influência do meio peritoneal na expressão dos genes estudados em mulheres com endometriose.

Neste trabalho foi encontrada diferença estatisticamente significativa para o gene *ID2*, que mostrou uma maior expressão na fase avançada da doença quando comparado a fase inicial e também no endometrioma ovariano quando comparado ao endométrio eutópico de pacientes com endometrioma.

As proteínas ID alteram componentes do ciclo celular normalmente envolvidos no mecanismo que regula sua progressão (Lasorella et al., 1996; Arnold et al., 2001). Um dos genes também envolvidos na regulação do ciclo celular é o gene do retinoblastoma (*RB*) que foi o primeiro supressor tumoral a ser clonado, e regula negativamente o ciclo celular através da sua habilidade de se ligar ao fator de transcrição E2F e reprimir a transcrição de genes necessários para a fase S do ciclo celular (Hanahan e Weinberg, 2000).

Super-expressão de *ID2* inativa pRb e também anula a atividade inibitória do ciclo celular das proteínas p107 e p130 relacionadas a pRb. A habilidade do gene *ID2* de abolir os efeitos de supressão de crescimento da pRb, p107 e p130 sugere uma explicação para o modelo de expressão de *ID2* no início e fim da fase G1 do ciclo celular após estimulação de fatores de crescimento celular (Barone et al., 1994; Hara et al., 1994). *ID2* talvez seja necessário para inativação seqüencial de alvos distintos representados por diferentes membros da família pRb, que de outra forma contem a progressão do ciclo celular através de associações reguladas com os fatores de transcrição E2F (Lasorella; Iavarone e Israel, 1996).

Goumenou et al. (2006), utilizando a técnica de imunohistoquímica analisaram se há diferença de expressão das proteínas p16, pRb e ciclina D1 em endometriomas e adenomiomas. A proteína p16 estava presente em 77% dos adenomiomas e 15% dos endometriomas, enquanto a pRb foi detectada em 28% dos endometriomas analisados e não foi detectada nos adenomiomas e a ciclina D1 não foi encontrada nos tecidos avaliados. Este trabalho demonstrou que p16 e pRb tem um importante papel na regulação do crescimento celular em adenomiomas e endometriomas, respectivamente. Os nossos resultados

evidenciaram uma maior expressão do gene *ID2* nos endometriomas ovarianos, e, como sua superexpressão pode inibir o papel de supressor tumoral da pRb em células cancerosas pode ser que na endometriose eles também atuem nessa mesma via.

O proto-oncogene *MYC* (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) codifica um fator de ligação ao DNA que pode ativar e reprimir a transcrição. Por este mecanismo, *MYC* regula a expressão de numerosos genes alvos que controlam importantes funções celulares, incluindo crescimento e progressão do ciclo celular. Desregulação da expressão de *MYC* resultante de vários tipos de alterações genéticas leva a atividade constitutiva de *MYC* em uma variedade de cânceres e oncogenes promotores (Dominguez-Sola et al., 2007). O gene *ID2* é um alvo do gene *MYC* (Lasorella et al., 2000) e em linhagens celulares de neuroblastomas sua expressão é induzida por N-*MYC* (Raetz et al., 2003; Wang et al., 2003). *ID2*, como todos os outros genes alvos de N-*MYC*, é também um alvo para *MYC* e estudos futuros indicarão uma correlação entre *MYC* e o mRNA do *ID2* em neuroblastomas primários (Vandesompele et al., 2003).

Meola et al.(2010), identificaram 291 genes com expressão alterada em lesões endometrióticas, entre eles o *MYC* foi encontrado como “*dow-regulated*” em endométrio ectópico comparado ao eutópico de mulheres com endometriose. Eles concluíram que essa alteração pode ser responsável pela perda de homeostase nas lesões endometrióticas. Johnson et al (2005) encontraram expressão mais alta de *MYC* no endométrio eutópico de mulheres com endometriose quando comparada ao endométrio de mulheres normais. Os dados relacionados à regulação e função de *MYC* são controversos na literatura. Embora não tenhamos analisado a expressão do gene *MYC*, ele pode estar envolvido na regulação do gene *ID2* nas lesões endometrióticas avaliadas.

Para o gene *PRELP* a diferença estatisticamente significativa foi encontrada no aumento da sua expressão na lesão peritoneal comparada ao endométrio eutópico de mulheres com endometriose peritoneal.

As pequenas proteoglicanas ricas em leucina (SLRPs), das quais o gene *PRELP* faz parte, são uma família bem conhecida de proteoglicanas presente em muitos tecidos conectivos. Papéis cruciais para estas macromoléculas na montagem da matriz e modulação do crescimento celular tem sido extensivamente mostrados na literatura (Hocking; Shinomura e McQuillan, 1998; Iozzo, 1999; Kresse e Schonherr, 2001; Ameye e Young, 2002).

O principal papel da matriz extracelular é ser a base estrutural dos tecidos, criando o ambiente primordial para as mudanças das células do sistema imunológico (Shimizu e Shaw, 1991; Gorski e Kupiec-Weglinski, 1995; Cowin, 2000; Pupa et al., 2002). Proteínas da matriz (colágeno, fibronectina, laminina) são responsáveis pela sinalização relacionada à proliferação (Bates; Lincz e Burns, 1995), migração (Iivanainen et al., 2003), diferenciação (Watt, 2002) ou apoptose (Hock et al., 2001) de muitos tipos de células durante o processo fisiológico e patológico (Gorski e Kupiec-Weglinski, 1995; Pupa et al., 2002). Isto sugere que na endometriose proteínas da matriz talvez sejam responsáveis por atrapalhar tais funções fisiológicas do endométrio como secreção (Gottschalk et al., 2000), implantação (Selam et al., 2002) e menstruação (Koks et al., 2000; Abrahamson et al., 1986).

Em 2009, Castells et al. demonstraram que o gene *PRELP* juntamente com *GFAP* (*glial fibrillary acidic protein*), *PTPRZ1* (*protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1*), *GPM6B* (*glycoprotein M6B*), podem prever com 100% de sensibilidade e especificidade a diferença entre glioblastoma multiforme e meningioma meningotelial..

Estudos prévios identificaram 22 microRNAs diferencialmente expressos em endométrio ectópico e eutópico de amostras pareadas de mulheres com e sem endometriose (Ohlsson Teague et al., 2009). Zhao et al. (2011) examinaram a presença de SNPs próximos

aos alvos destes miRNAs, e, dentre os 102 SNPs analisados para diferentes genes em mulheres com endometriose e controle, o SNP, rs7542469, para o gene *PRELP* foi encontrado no grupo controle, não sendo relacionado com a endometriose.

Embora na literatura prévia o gene *PRELP* não esteja relacionado a endometriose, nossos resultados da análise da expressão por PCR em tempo real demonstraram uma maior expressão deste gene em lesões peritoneais. O que pode estar relacionado a alterações no ambiente peritoneal responsáveis pela transformação do endométrio em lesão endometriótica.

Nas análises estatísticas realizadas com todas as lesões endometrióticas juntas, o gene *SMOC2* foi mais expresso na lesão (endometrioma e peritoneal) quando comparado ao endométrio eutópico de mulheres com endometriose. Este resultado corrobora com os achados por Eyster et al. (2007), que analisaram o modelo de expressão gênica em endométrio ectópico e eutópico de 11 pacientes para identificar possíveis famílias de genes envolvidas na endometriose. Neste screening, que utilizou a técnica de microarray, dos 717 genes analisados, o gene *SMOC2*, dentre outros, foi encontrado como mais expresso nas lesões endometrióticas (endometrioma e peritoneal) em relação ao endométrio eutópico.

Visto que a PCR em tempo real é o padrão ouro para quantificação de expressão gênica é possível que o *SMOC2* possa estar relacionado a vias de desenvolvimento da endometriose, participando diretamente do desenvolvimento da mesma.

6 - CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a expressão dos genes *ID2*, *PRELP* e *SMOC2* sofre influência do meio peritoneal, podendo ser alterada dependendo do local da implantação (ovário ou peritônio).

O gene *ID2* foi mais expresso nos endometriomas ovarianos quando comparados ao endométrio eutópico de mulheres com endometriose.

O gene *PRELP* foi mais expresso na lesão peritoneal quando comparado ao endométrio eutópico de mulheres com endometriose.

O gene *SMOC2* foi mais expresso na lesão (endometrioma e peritoneal) quando comparado ao endométrio eutópico de mulheres com endometriose.

A expressão dos genes *ID2*, *PRELP* e *SMOC2* no endométrio de mulheres sem endometriose é igual à expressão gênica no endométrio eutópico de mulheres com endometriose.

BIBLIOGRAFIA

ABRAHAMSON, D. R. Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. **J Pathol**, 149:267–78, 1986.

AGHAJANOVA, L., VELARDE, M. C., GIUDICE, L. C. Altered gene expression profiling in endometrium: evidence for progesterone resistance. **Semin Reprod Med**, 28(1):51-8, 2010.

ALANI, R. M., HASSKARL, J., GRACE, M., HERNANDEZ, M. C., ISRAEL, M. A., MUNGER, K. Immortalization of primary human keratinocytes by the helix-loop-helix protein, Id-1. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96(17):9637-41, 1999.

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis. **Fertil Steril**, 67:817-821, 1997.

AMEYE, L. e YOUNG, M. F. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. **Glycobiology**, 12:107R-16R, 2002.

ARAVIN, A. A., HANNON, G. J., BRENNECKE, J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. **Science**, 318:761-64, 2007.

ARNOLD, J. M., MOK, S. C., PURDLE, D., CHENEVIX-TRENCH, G. Decreased expression of the ID3 gene at 1p36.1 in ovarian adenocarcinomas. **Br. J. Cancer**, 84:352–59, 2001.

ARYA, P. e SHAW, R. Endometriosis: Current thinking. *Curr Obstet Gynaecol*; 15:191–98, 2005.

BARONE, M. V., PEPPERKOK, R., PEVERALI, F. A., PHILIPSON, L. Id proteins control growth induction in mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91:4985–8, 1994.

BATES, R. C., LINCZ, L. F., BURNS, G. F. Involvement of integrins in cell survival. **Cancer Metastasis Rev**, 14:191–203 (Review), 1995.

BENEZRA, R., DAVIS, R. L., LOCKSHON, D., TURNER, D. L., WEINTRAUB, H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. **Cell**, 61:49-59, 1990.

BENEZRA, R., RAFII, S., LYDEN, D. The Id proteins and angiogenesis. **Oncogene**, 20(58):8334-41, 2001

BENGTSSON, E., NEAME, P. J., HEINEGÅRD, D., SOMMARIN, Y. The primary structure of a basic leucine-rich repeat protein, PRELP, found in connective tissues. **J. Biol. Chem**, 270:25639–44, 1995.

BENGTSSON, E., ASPBERG, A., HEINEGARD, D., SOMMARIN, Y., SPILLMANN, D. The amino-terminal part of PRELP binds to heparin and heparan sulfate. **J Biol Chem**, 275(52):40695-702, 2000.

BENGTSSON, E., MÖRGELIN, M., SASAKI, T., TIMPL, R., HEINEGÅRD, D., ASPBERG, A. The leucine-rich repeat protein PRELP binds perlecan and collagens and may function as a basement membrane anchor. **J Biol Chem**, 277:15061–8, 2002.

BIDANSET, D. J., GUIDRY, C., ROSENBERG, L. C., CHOI, H. U., TIMPL, R., HOOK, M. Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. **J. Biol. Chem**, 267:5250–6, 1992.

BORNSTEIN, P., SAGE, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Curr Opin Cell Biol**, 14(5):608-16, 2002.

BRINTON, L. A., GRIDLEY, G., PERSSON, I., BARON, J., BERGQVIST, A. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. **Am J Obstet Gynecol**, 176:572–9, 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**, 18:285-303, 2004.

BURNEY, R. O., TALBI, S., HAMILTON, A. E., VO, K. C., NYEGAARD, M., NEZHAT, C. R. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. **Endocrinology**, 148:3814–26, 2007.

BURNEY, R.O., HAMILTON, A.E., AGHAJANOVA, L., VO, K.C., NEZHAT, C.N., LESSEY, B.A., GIUDICE, L.C. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. **Mol Hum Reprod**, 15(10):625-31, 2009.

CARDIN, A. D. e WEINTRAUB, H. J. Molecular modeling of proteinlycosaminoglycan interactions. **Arteriosclerosis**, 9:21–32, 1989.

CARVALHO, L., PODGAEC, S, BELLODI-PRIVATO, M., FALCONE, T., ABRÃO, M. S. Role of Eutopic Endometrium in Pelvic Endometriosis. **J Minim Invasive Gynecol**, 18(4):419-27, 2011. .

CASTELLS, X., GARCÍA-GÓMEZ, J. M., NAVARRO, A., ACEBES, J. J., GODINO, O., BOLUDA, S., BARCELÓ, A., ROBLES, M., ARIÑO, J., ARÚS, C. Automated brain tumor biopsy prediction using single-labeling cDNA microarrays-based gene expression profiling. **Diagn Mol Pathol**, 18(4):206-18, 2009.

CHEN, B., LIM, R. W. Physical and functional interactions between the transcriptional inhibitors Id3 and ITF-2b. Evidence toward a novel mechanism regulating muscle-specific gene expression. **J Biol Chem**, 272(4):2459-63, 1997.

COOK, R. D., WEISBERG, S. Transforming a response variable for linearity. **Biometrika**, 81:731-7, 1994.

COWIN, S. C. How is a tissue built? **J Biomech Eng**, 122:553-69 (Review), 2000.

CRAMER, D. W., MISSMER, S. A. The epidemiology of endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, 955:11-22, 2002.

DAVIS, R. L., CHENG, P. F., LASSAR, A. B., WEINTRAUB, H. The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. **Cell** 60:733-46, 1990.

DOMINGUEZ-SOLA, D., YING, C. Y., GRANDORI, C., RUGGIERO, L., CHEN, B., LI, M., GALLOWAY, D. A., GU, W., GAUTIER, J., DALLA-FAVERA, R. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. **Nature**, 448(7152):445-51, 2007.

ESKENAZI, B., WARNER, M. L. Epidemiology of endometriosis. **Obstet Gynecol Clin North Am**, 24(2):235-58, 1997.

EYSTER, K. M., KLINKOVA, O., KENNEDY, V., HANSEN, K. A. Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrium. **Fertil Steril**, 88(6):1505-33, 2007.

FILIGHEDDU, N., GREGNANIN, I., PORPORATO, P.E., SURICO, D., PEREGO, B., GALLI, L., PATRIGNANI, C., GRAZIANI, A., SURICO, N. Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. **J Biomed Biotechnol**, 2010:1-29, 2010.

FONG, S., DEBS, R.J., DESPREZ, P.Y. Id genes and proteins as promising targets in cancer therapy. **Trends Mol Med**, 10(8):387-92, 2004.

FRAIDENRAICH, D., STILLWELL, E., ROMERO, E., WILKES, D., MANOVA, K., BASSON, C.T., BENEZRA, R. Rescue of cardiac defects in id knockout embryos by injection of embryonic stem cells. **Science**, 306(5694):247-52, 2004.

GIUDICE, L. C., KAO, L. C. Endometriosis. **Lancet**, 364:1789–99, 2004.

GOODSAID, F. M., PALAMANDA, J. R., MONTGOMERY, D., MANDAKAS, G., GU, C., LI, Z., YOU, X., NORTON, L., SMITH, R., CHU, I., SOARES, T., ALTON, K., KISHNANI, N. S., ROSENBLUM, I. Y. Assessment of temporal biochemical and gene transcription changes in rat liver cytochrome P450: utility of real-time quantitative RT-PCR. **Pharm Res.**, 20(9):1373-80, 2003.

GORSKI, A., KUPIEC-WEGLINSKI, J. W. Extracellular matrix proteins, regulators of T-cell functions in healthy and diseased individuals. **Clin Diag LabImmunol**, 2:646–51, 1995.

GORZELNIAK, K., JANKE, J., ENGELI, S., SHARMA, A. M. Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. **Horm Metab Res**, 33:625–7, 2001.

GOTTSCHALK, C., MALBERG, K., ARNDT, M., SCHMITT J, ROESSNER A, SCHULTZE D, KLEINSTEIN J, ANSORGE S. Matrix metalloproteinases and TACE play a role in the pathogenesis of endometriosis. **Adv Exp Med Biol**, 477:483–6, 2000.

GOUMENOU, A. G., MATALLIOTAKIS, I. M., TZARDI, M., FRAGOULI, I. G., MAHUTTE, N. G., ARICI, A. p16, retinoblastoma (pRb), and cyclin D1 protein expression in human endometriotic and adenomyotic lesions. **Fertil Steril**, Suppl 1:1204-7, 2006.

GROVER, J., CHEN, X-N., KORENBERG, J. R., RECKLIES, A. D., ROUGHLEY, P. J. The gene organization, chromosome location, and expression of a 55-kDa matrix protein (PRELP) of human articular cartilage. **Genomics**, 38:109-117, 1996.

GUO. S. W. Epigenetics of endometriosis. **Mol Hum Reprod**, 15:587-607, 2009.

HALME, J., HAMMOND, M., HULKA, J., RAJ, S., TALBERT, L. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. **Obstet Gynecol**, 64:151-4, 1984.

HANAHAH, D., WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100(1):57-70, 2000.(Review).

HANSEN, K. A., EYSTER, K. M. Genetics and genomics of endometriosis. **Clin Obstet Gynecol**, 53(2):403-12, 2010.

HARA, E., YAMAGUCHI, T., NOJIMA, H., IDE, T., CAMPISI, J., OKAYAMA, H., ODA, K. Id-related genes encoding helix-loop-helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. **J. Biol. Chem**, 269:2139–45, 1994.

HASSKARL, J. e MUNGER, K. Id proteins--tumor markers or oncogenes? **Cancer Biol Ther**, 1(2):91-6, 2002.

HEDBOM, E. e HEINEGÅRD, D. Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. **J. Biol. Chem**, 268:27307–12, 1993.

HEINEGÅRD, D., LARSSON, T., SOMMARIN, Y., FRANZEN, A., PAULSSON, M., HEDBOM, E. Two novel matrix proteins isolated from articular cartilage show wide distributions among connective tissues. **J. Biol. Chem**, 261:13866–72, 1986.

HOCK, J. M., KRISHNAN, V., ONYIA, J. E., BIDWELL, J. P., MILAS, J., STANISLAUS, D. Osteoblast apoptosis and bone turnover. **J Bone Miner Res**, 16:975–84 (Review), 2001.

HOCKING, A. M., SHINOMURA, T., MCQUILLAN, D. J. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. **Matrix Biol**, 17:1–19, 1998.

HU, Y. C., LAM, K. Y., LAW, S., WONG, J., SRIVASTAVA, G. Identification of differentially expressed genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) by cDNA expression array: overexpression of Fra-1, neogenin, Id-1, and CDC25B genes in ESCC. **Clin. Cancer Res**, 7(8):2213-21, 2001.

IIVANAINEN, E., KAHARI, V. M., HEINO, J., ELENIOUS, K. Endothelial cell-matrix interactions. **Microsc Res Tech**, 60:13–22 (Review), 2003.

IOZZO, R. V. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol**, 32:141–74, 1997.

IOZZO, R. V. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. **J Biol Chem**, 274:18843-6, 1999.

IOZZO, R. V., MURDOCH, A. D. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. **FASEB J**, 10(5):598-614, 1996.

JOHNSON, M. C., TORRES, M., ALVES, A., BACALLAO, K., FUENTES, A., VEGA, M., BORIC, M. A. Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. **Reprod Biol Endocrinol**, 3:45, 2005.

JUO, S. H., WANG, T. N., LEE, J. N., WU, M. T., LONG, C. Y., TSAI, E. M. CYP17, CYP1A1 and COMT polymorphisms and the risk of adenomyosis and endometriosis in Taiwanese women. **Hum Reprod**, 21(6):1498-502, 2006.

JURGENSEN, A., METTLER, L., VOLKOV, N. I., PARWARESCH, R.. Proliferative activity of the endometrium throughout the menstrual cycle in infertile women with and without endometriosis. **Fertil Steril**, 66:369-75, 1996.

KAMERGORODSKY, G., RIBEIRO, P. A. A., GALVÃO, M. A. L., ABRÃO, M. S., LEMOS, N. B., DONADIO, N., AOKI, T. Avaliação da classificação histológica da endometriose observada em implantes de mulheres portadoras de endometriose pélvica superficial e profunda. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 29(11), 2007.

KEBEBEW, E. Id1 gene expression and regulation in human thyroid tissue. **Thyroid**, 15(6):522-530, 2005.

KENNEDY, S., HADFIELD, R., MARDON, H., BARLOW, D. Age of onset of pain symptoms in non-twin sisters concordant for endometriosis. **Hum Reprod.**, 11:403-5, 1996.

KOBE, B., DEISENHOFER, J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. **Trends Biochem Sci**, 19(10):415-21, 1994

KOKS, C. A., GROOTHUIS, P. G., DUNSELMAN, G. A., DE GOEIJ, A. F., EVERS J. L. Adhesion of menstrual endometrium to extracellular matrix: the possible role of integrin alpha(6)beta(1) and laminin interaction. **Mol Hum Reprod**, 6:170-7, 2000.

KRESSE, H. e SCHONHERR, E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. **J Cell Physiol**, 189:266-74, 2001.

LANGLANDS, K., YIN, X., ANAND, G., PROCHOWNIK, E. V. Differential interactions of Id proteins with basic-helix-loop-helix transcription factors. **J Biol Chem**, 272(32): 19785-93, 1997.

LASORELLA, A., IAVARONE, A., ISRAEL, M. A. Id2 specially alters regulation of the cell cycle by tumor suppressor proteins. **Mol. Cell. Biol.**, 16:2570-8, 1996.

LASORELLA, A., NOSEDA, M., BEYNA, M., YOKOTA, Y. IAVARONE, A. Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. **Nature**, 407:592-8, 2000.

LASSAR, A. B., SKAPEK, S. X., NOVITCH, B. Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal. **Current Opinion in Cell Biology**, 6:788-94, 1994.

LEBOVIC, D. I., MUELLER, M. D., TAYLOR, R. N. Immunobiology of endometriosis. **Fertil Steril**, 75:1-9, 2001

LIMA, A. P., SILVA E ROSA, A. M., MOURA, M. D. Concentrações de FSH, LH, estradiol, progesterona e histamina no soro, no fluido peritonial e no fluido folicular de mulheres com e sem endometriose. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 28(11), 2006.

LIU, P., LU, J., CARDOSO, W. V., VAZIRI, C. The SPARC-related factor SMOC-2 promotes growth factor-induced cyclin D1 expression and DNA synthesis via integrin-linked kinase. **Mol Biol Cell**, (1):248-61, 2008.

LYDEN, D., HATTORY, K., DIAS, S., COSTA, C., BLAIKIE, P., BUTROS, L., CHADBURN, A., HEISSIG, B., MARKS, W., WITTE, L., WU, Y., HICKLIN, D., ZHU, Z., HACKETT, N.R., CRYSTAL, R.G., MOORE, M.A., HAJJAR, K.A., MANOVA, K., BENEZRA, R., RAFII, S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. **Nat Med**, 7(11):1194-201, 2001.

MAIER, S., PAULSSON, M., HARTMANN, U. The widely expressed extracellular matrix protein SMOC-2 promotes keratinocyte attachment and migration. **Exp Cell Res**, 314(13):2477-87, 2008.

MANTHEY, C., MERN, D. S., GUTMANN, A., ZIELINSKI, A. J., HERZ, C., LASSMANN, S., HASSKARL, J. Elevated endogenous expression of the dominant negative basic helix-loop-helix protein ID1 correlates with significant centrosome abnormalities in human tumor cells. **BMC Cell Biology**, 11:2, 2010.

MARUYAMA, H., KLEEFF, J., WILDI, S., FRIESS, H., BUCHLER, M. W., ISRAEL, M. A., KORC, M. Id-1 and Id-2 are overexpressed in pancreatic cancer and in dysplastic lesions in chronic pancreatitis. **Am J Pathol**, 155(3):815-22, 1999.

MATHEW, S., CHEN, W., MURTY, V. V., BENEZRA, R., CHANGANTI, R. S. Chromosomal assignment of human ID1 and ID2 genes. **Genomics**, 30(2):385-7, 1995.

MATSUZAKI, S., CANIS, M., VAURS-BARRIE 'RE, C., BOESPfUG-TANGUY, O., DASTUGUE, B., MAGE, G. DNA microarray analysis of gene expression in eutopic endometrium from patients with deep endometriosis using laser capture microdissection. **Fertil Steril**, 84(Suppl 2):1180-90, 2004.

MAW, M. K., FUJIMOTO, J., TAMAYA, T. Expression of the inhibitor of DNA-binding (ID)-1 protein as an angiogenic mediator in tumour advancement of uterine cervical cancers. **Br J Cancer**, 99(10):1557-63, 2008.

MELCHING, L. I., ROUGHLEY, P. J. A matrix protein of Mr 55,000 r that accumulates in human articular cartilage with age. **Biochim. Biophys. Acta**, 1036:213-20, 1990.

MELIN, A., SPARÉN, P., PERSSON, I., BERGQVIST, A. Endometriosis and the risk of cancer with special emphasis on ovarian cancer. **Hum Reprod**. 21:1237-42, 2006.

MEOLA, J., ROSA E SILVA, J. C., DENTILLO, D. B., DA SILVA, W. A. JR., VEIGA-CASTELLI, L. C., BERNARDES, L. A., FERRIANI, R. A., DE PAZ, C. C., GIULIATTI, S., MARTELLI, L. Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. **Fertil Steril**, 93(6):1750-73, 2010.

METTLER, L., SALMASSI, A., SCHOLLMAYER, T., SCHMUTZLER, A. G., PU NGEL, F., JONAT, W. Comparison of c-DNA microarray analysis of gene expression between eutopic endometrium and ectopic endometrium (endometriosis). **J Assist Reprod Genet**, 24(6):249-58, 2007.

NEZHAT, F., DATTA, M. S., HANSON, V., PEJOVIC, T., NEZHAT, C., NEZHAT, C. The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review. **Fertil Steril**, 90:1559-70, 2008.

NICKOLOFF, B. J., CHATURVEDI, V., BACON, P., QIN, J. Z., DENNING, M. F., DIAZ, M. O. Id-1 delays senescence but does not immortalize keratinocytes. **J Biol Chem**, 275(36):27501-4, 2000.

NISHIMOTO, S., HAMAJIMA, Y., TODA, Y., TOYODA, H., KITAMURA, K., KOMURASAKI, T. Identification of a novel smooth muscle associated protein, smap2, upregulated during neointima formation in a rat carotid endarterectomy model **Biochimica et Biophysica Acta**, 1576:225-230, 2002.

NISOLLE, M., CASANAS-ROUX, F., DONNEZ, J. Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis. **Fertil Steril**, 68:912-9, 1997.

NORTON, J. D., DEED, R. W., CRAGGS, G., SABLITZSKY, F. Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. **Trends Cell. Biol.**, 8:58-65, 1998.

NYHOLT, D. R., GILLESPIE, N. G., MERIKANGAS, K. R., TRELOAR, S. A., MARTIN, N. G., MONTGOMERY, G. W. Common genetic influences underlie comorbidity of migraine and endometriosis. **Genet Epidemiol**, 33:105-13, 2009.

OHLSSON TEAGUE, E. M., VAN DER HOEK, K. H., VAN DER HOEK, M. B., PERRY, N., WAGAARACHCHI, P., ROBERTSON, S. A., PRINT, C. G., HULL, L. M. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. **Mol Endocrinol**, 23(2):265-75, 2009.

OHLSSON TEAGUE, E.M.C., PRINT, C.G., HULL, M.L. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. **Hum Reprod Update**, 16(2):142-65, 2010.

OLSON, J. E., CERHAN, J. R., JANNEY, C. A., ANDERSON, K. E., VACHON, C. M., SELLERS, T. A. Postmenopausal cancer risk after self-reported endometriosis diagnosis in the Iowa women's health study. **Cancer**, 94:1612-8, 2002.

OOSTERLYNCK, D.J., CORNILLIE, F.J., WAER, M., VANDEPUTTE, M., KONINCKY, P.Q. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. **Fertil Steril**, 56:51-5, 1991.

PAN, Q., LUO, X., TOLOUBEYDOKHTI, T., CHEGINI, N. The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. **Mol Hum Reprod**, 13(11):797-806, 2007.

PELCH, K. E., SCHRODER, A. L., KIMBAL, P. A., SHARPE-TIMMS, K. L., DAVIS, S. C. Aberrant gene expression profile in a mouse model of endometriosis mirrors that observed in women. **Fertil Steril**, 93(5):1615-27, 2010.

PERK, J., IAVARONE, A., BENEZRA, R. Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. **Nat Rev Cancer**, 5(8):603-14, 2005.

PESCE, S., BENEZRA, R. The loop region of the helix-loop-helix protein Id1 is critical for its dominant negative activity. **Mol Cell Biol**, 13(12):7874-80, 1993.

POLSKY, D., YOUNG, A. Z., BUSAM, K. J., ALANI, R. M. The Transcriptional Repressor of p16/Ink4a, Id1, Is Up-Regulated in Early Melanomas. **Cancer Res**, 61(16):6008-1, 2001.

PUPA, S. M., MENARD, S., FORTI, S., TAGLIABUE, E. New insights into the role extracellular matrix during tumor onset and progression. **J Cell Physiol**, 192:259-67, 2002.

RAETZ, E. A., KIM, M. K., MOOS, P., CARLSON, M., BRUGGERS, C., HOOPER, D. K., FOOT, L., LIU, T., SEEGER, R., CARROLL, W. L. Identification of genes that are regulated transcriptionally by Myc in childhood tumors. **Cancer**, 98:841-53, 2003.

RAMÓN, L.A., BRAZA-BOILS, A., GILABERT-ESTELLÉS, J., GILABERT, J., ESPAÑA, F., CHIRIVELLA, M., ESTELLÉS, A. microRNAs expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors. **Hum Reprod**, 26(5):1082-90, 2011.

REINHART, B. J. e BARTEL, D. P. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. **Science**, 297, 1831, 2002.

ROCNIK, E. F., LIU, P., SATO, K., WALSH, K., VAZIRI, C. The novel SPARC family member SMOC-2 potentiates angiogenic growth factor activity. **J Biol Chem**, 281(32):22855-64, 2006.

SAGE, E. H., REED, M., FUNK, S. E., TRUONG, T., STEADELE, M., PUOLAKKAINEN, P., MAURICE, D. H., BASSUK, J. A. Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metalloproteinase 3 produces polypeptides that influence angiogenesis. **J Biol Chem**, 278(39):37849-57, 2003.

SAMPSON, J. A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissues into the peritoneal cavity. **Am J Obstet Gynecol**, 14:422-69, 1927.

SCHINDL, M., OBERHUBER, G., OBERMAIR, A., SCHOPPMANN, S. F., KARNER, B., BIRNER, P. Overexpression of id-1 protein is a marker for unfavorable prognosis in early-stage cervical cancer. **Cancer Res**, 61(15):5703-06, 2001.

SCHOPPMANN, S. F., SCHINDL, M., BAYER, G., AUMAYR, K., DIENES, J., HORVAT, R., RUDAS, M., GNANT, M., JAKESZ, R., BIRNER, P. Overexpression of Id-1 is associated with poor clinical outcome in node negative breast cancer. **Int J Cancer**, 104(6):677-82, 2003.

SELAM, B., KAYISLI, U. A., GARCIA-VELASCO, J. A., ARICI, A. Extracellular matrix-dependent regulation of Fas ligand expression in human endometrial stromal cells. **Biol Reprod**, 66:1-5, 2002.

SHERWIN, J. R., SHARKEY, A. M., MIHALYI, A., SIMSA, P., CATALANO, R. D., D'HOOOGHE, T. M. Global gene analysis of late secretory phase, eutopic endometrium does not provide the basis for a minimally invasive test of endometriosis. **Hum Reprod**, 23(5):1063-8, 2008.

SHIMIZU, Y. e SHAW, S. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. **FASEB J**, 5:2292-9, 1991.

SIKDER, H. A., DEVLIN, M. K., DUNLAP, S., RYU, B., ALANI, R. M. Id proteins in cell growth and tumorigenesis. **Cancer Cell**, 3(6):525-30, 2004.

SOMMARIN, Y., LARSSON, T., HEINEGÅRD, D. Chondrocyte-matrix interactions. Attachment to proteins isolated from cartilage. **Exp Cell Res**, 184(1):181-92, 1989.

TANG, J., GORDON, G. M., NICKOLOFF, B. J., FOREMAN, K. E. The helix-loop-helix protein id-1 delays onset of replicative senescence in human endothelial cells. **Lab Invest**, 82(8):1073-9, 2002.

TASHEVA, E.S., KLOCKE, B., CONRAD, G.W. Analysis of transcriptional regulation of the small leucine rich proteoglycans. **Mol Vis**, 10:758-72, 2004.

THELLIN, O., ZORZI, W., LAKAYE, B., DE BORMAN, B., COUMANS, B., HENNEN, G., GRISAR, T., IGOUT, A., HEINEN, E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **J Biotechnol**, 8: 291-5, 1999.

ULUKUS, M., CAKMAK, H., ARICI, A. The role of endometrium in endometriosis. **J Soc Gynecol Investig**, 17(7), 2006.

ULUKUS, M., ULUKUS, E. C., TAVMERGEN GOKER, E. N., TAVMERGEN, E., ZHENG, W., ARICI, A. Expression of interleukin-8 and monocyte chemotactic protein 1 in women with endometriosis. **Fertil Steril.**, 91:687-93, 2009.

VANDESOMPELE, J., EDSJÖ, A., DE PRETER, K., AXELSON, H., SPELEMAN, F., PÅHLMAN, S. ID2 expression in neuroblastoma does not correlate to MYCN levels and lacks prognostic value. **Oncogene**, 22:456-60, 2003.

VANNAHME, C., GOSLING, S., PAULSSON, M., MAURER, P., HARTMANN, U. Characterization of SMOC-2, a modular extracellular calcium-binding protein. **Biochem J**, 373:805-14, 2003.

VIGANÒ, P., VERCELLINI, P., DI BLASIO, A.M., COLOMBO, A., CANDIANI, G.B., VIGNALI, M. Deficient antiendometrium lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. **Fertil. Steril**, 56:51-5, 1991.

VIGANÒ, P., SOMIGLIANA, E., CHIODO, I., ABBIATI, A., VERCELLINI, P. Molecular mechanisms and biological plausibility underlying the malignant transformation of endometriosis: a critical analysis. **Hum Reprod Update**, 12:77-89, 2006.

VOGEL, K. G., PAULSSON, M. e HEINEGÅRD, D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. **Biochem. J**, 223:587-97, 1984.

VORONOVA, A. e BALTIMORE, D. Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 87:4722-6, 1990.

WANG, Q., HUI, G., SHUSTERMAN, S., MOSSE, Y., WINTER, C. L., GUO, C., ZHAO, H., RAPPAPORT, E., HOGARTY, M. D., MARIS, J. M. ID2 expression is not associated with MYCN amplification or expression in human neuroblastomas. **Cancer Res**, 63:1631-5, 2003.

WATT, F. M. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. **EMBO J**, 21:3919-26 (Review), 2002.

WEISS, G., GOLDSMITH, L. T., TAYLOR, R. N., BELLET, D., TAYLOR, H. S. Inflammation in reproductive disorders. **Reprod Sci**, 16:216-29, 2009.

WILK, J.B., HERBERT, A., SHOEMAKER, C.M., GOTTLIEB, D.J., KARAMOHAMED, S. Secreted modular calcium-binding protein 2 haplotypes are associated with pulmonary function. **A. J Respir Crit Care Med**, 175:554-60, 2007.

WINGFIELD, M., MACPHERSON, A., HEALY, D. L., ROGERS, P. A. Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. **Fertil Steril**, 64:340-6, 1995.

WITZ, C. A. Cell adhesion molecules and endometriosis. **Semin Reprod Med**, 21:173-82, 2003.

WU, Y., KAJDACSY-BALLA, A., STRAWN, E., BASIR, Z., HALVERSON, G., JAILWALA, P., WANG, Y., WANG, X., GHOSH, S., GUO, S. W. Transcriptional characterizations of differences between eutopic and ectopic endometrium. **Endocrinology**, 147(1):232-46, 2006.

YATES, P. R., ATHERTON, G. T., DEED, R. W., NORTON, J. D., SHARROCKS, A. D. Id helix-loop-helix proteins inhibit nucleoprotein complex formation by the TCF ETS-domain transcription factors. **EMBO J**, 18:968-76.

YING, Q. L., NICHOLS, J., CHAMBERS, I., SMITH, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. **Cell**, 115(3):281-92, 2003.

ZHAO, Z. Z., CROFT, L., NYHOLT, D. R., CHAPMAN, B., TRELOAR, S. A., HULL, M. L., MONTGOMERY, G. W. Evaluation of polymorphisms in predicted target sites for micro RNAs differentially expressed in endometriosis. **Mol Hum Reprod**, 17(2):92-103, 2011.

ANEXO

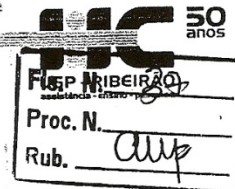
Anexo A – Aprovação do Banco de Amostras pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

COPIA

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 11 de abril de 2007


Ofício nº 1153/2007
CEP/SPC

Prezado Professor,

O Comitê de Ética em Pesquisa recebeu carta, onde Vossa Senhoria encaminha a solicitação para criação e reconhecimento do banco de amostras de sangue, tecido de lesão de endometriose e de endométrio de pacientes portadoras de endometriose.

Sobre o assunto, o Comitê de Ética em Pesquisa em sua 244ª Reunião Ordinária realizada em 09.04.2007, analisou a proposta de criação e a enquadrando na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 9699/2006.

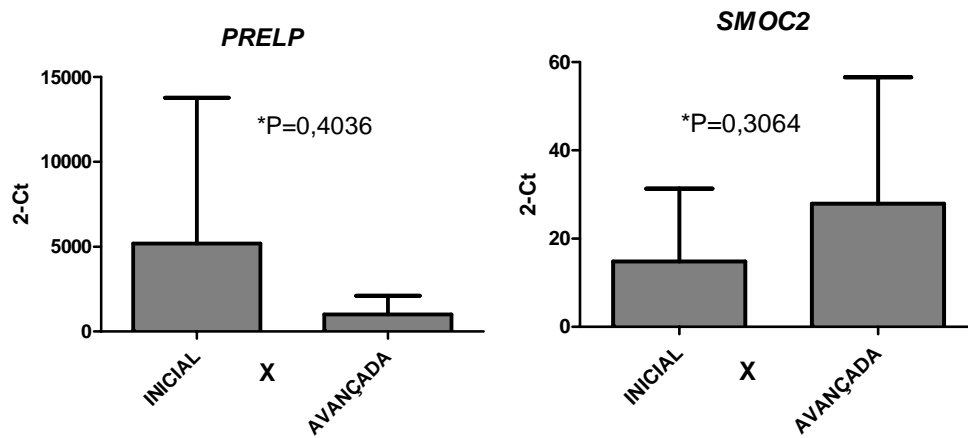
Atenciosamente.


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

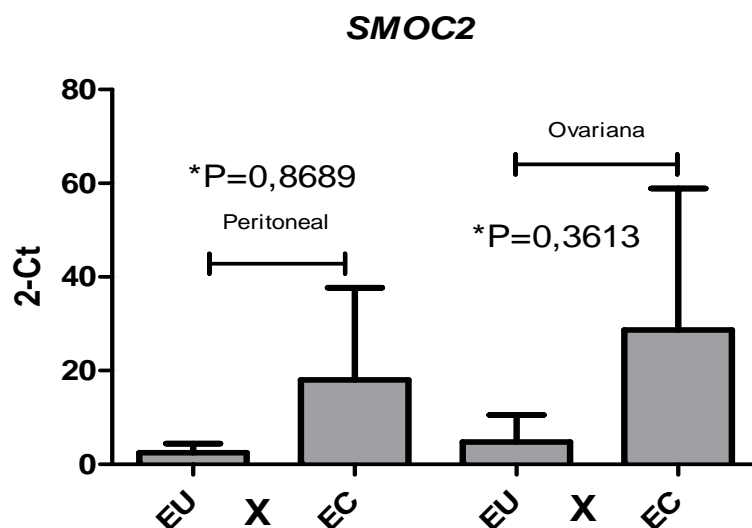
Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. RUI ALBERTO FERRIANI
Depto. de Ginecologia e Obstetrícia

APÊNDICES

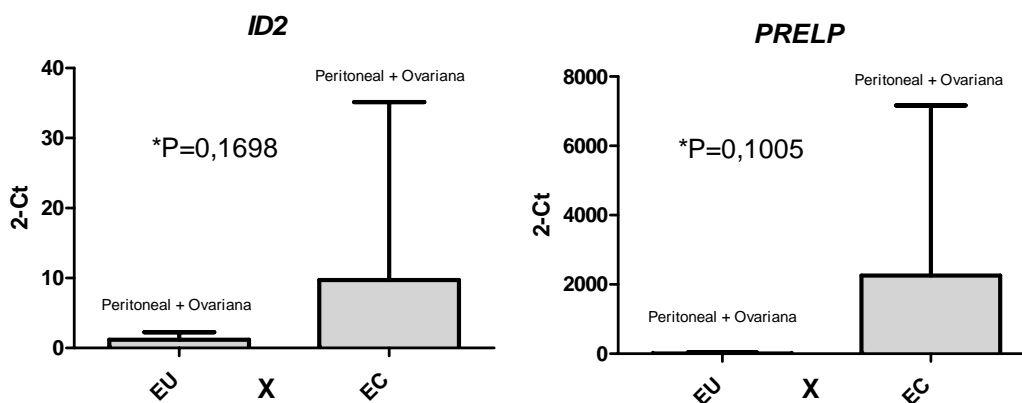
Apêndice A - Análise da expressão dos genes *PRELP* e *SMOC2* entre o estadio I + II (fase inicial) x estádio III + IV (fase avançada). Sem diferença significativa para $P < 0,05$. $2^{-\Delta\Delta Ct} =$ quantificação relativa.



Apêndice B – Análise da expressão do gene *SMOC2* entre endométrio eutópico de mulheres com lesão peritoneal e a lesão peritoneal e entre o endométrio eutópico de mulheres com endometrioma ovariano e o endometrioma ovariano sem diferença significativa para $P < 0,05$. $2^{-Ct} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ - quantificação relativa. EU= endométrio eutópico de mulheres com endometriose; EC= endométrio ectópico de mulheres com endometriose.



Apêndice C – Análise da expressão do gene *ID2* entre endométrio eutópico de mulheres com endometriose e o endométrio ectópico de mulheres com endometriose. Sem diferença significativa para $P < 0,05$. $2^{-Ct} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ - quantificação relativa. EU= endométrio eutópico de mulheres com endometriose; EC= endométrio ectópico de mulheres com endometriose.



MANUSCRITO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO GENE *ID2* EM ENDOMÉTRIO ECTÓPICO E EUTÓPICO DE MULHERES COM E SEM ENDOMETRIOSE NA FASE PROLIFERATIVA DO CICLO MENSTRUAL

RESUMO: Endometriose é uma doença de etiopatogenia complexa e multifatorial, caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina principalmente no peritônio pélvico e ovários. Nosso objetivo foi analisar a expressão do gene *ID2* em endométrio de mulheres sem endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual e compará-la a expressão gênica em endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose na mesma fase do ciclo menstrual. Foram avaliadas amostras teciduais pareadas de 20 mulheres, sendo 10 de endométrio e lesões endometrióticas peritoneais e 10 de endométrio eutópico e endometriomas ovarianos na fase proliferativa do ciclo menstrual. Como controle (C) foi coletado 16 amostras de endométrio de mulheres sem endometriose, na mesma fase do ciclo menstrual. A análise da expressão foi feita através da PCR em tempo real. A análise estatística mostrou que não houve diferença na expressão gênica entre o endométrio de mulheres sem endometriose e o endométrio eutópico de mulheres com endometriose. O gene *ID2* foi mais expresso no endometrioma ovariano quando comparado ao endométrio de mulheres com a lesão e na fase avançada quando comparada a fase inicial. Nossos resultados sugerem que a expressão deste gene sofre influência do meio peritoneal. Como o gene *ID2* está envolvido em algumas vias de regulação do crescimento e manutenção de tumores, que são características comuns a endometriose, pode ser que nesta, ele atue reprimindo o gene *Rb* que é um supressor tumoral.

INTRODUÇÃO

Endometriose é uma doença de etiopatogenia complexa e multifatorial, envolvendo predisposição genética, fatores ambientais, anatômicos, endócrinos e alterações imunológica. Muitas vezes é progressiva, caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina - principalmente no peritônio pélvico e ovários, levando á processos inflamatórios, reação cicatricial e formação de aderências, associados à infertilidade e dor pélvica crônica. É uma patologia comum, de caráter benigno, estrógeno-dependente, que afeta de 10 a 15 % das mulheres em idade reprodutiva, 35 a 50% das mulheres com infertilidade, dor pélvica ou ambos (Cramer e Missmer, 2002; Giudice e Kao, 2004).

Apesar de ser uma das doenças mais estudadas em ginecologia, sua etiologia ainda não está clara e várias são as teorias atuais para explicá-la (Ulukus et al., 2009; Carvalho et al., 2011). A mais aceita é a teoria de Sampson ou fluxo menstrual retrógrado (1927), que aponta a presença de células endometriais viáveis no fluxo menstrual retrógrado como causador das lesões.

O desenvolvimento da endometriose parece ser um fenômeno complexo, facilitado por fatores múltiplos, incluindo: quantidade e qualidade de células endometriais no fluido peritoneal, atividade inflamatória, expressão aumentada de moléculas de adesão, angiogênese, apoptose reduzida, escape do sistema imunológico e aumento da proliferação celular (Lima et al., 2006; Ulukus et al., 2006). A genética da endometriose é complexa, no entanto, acredita-se que ela é herdada de um modo poligênico/multifatorial e há predisposição familiar para o seu desenvolvimento.

Estudos moleculares tem focado esforços consideráveis na expressão, regulação e herança de genes na endometriose. Um grande número de genes candidatos tem sido avaliado para sua associação com endometriose, como os genes envolvidos na inflamação, síntese de esteróide, desintoxicação, receptores de hormônios, metabolismo de estrógeno, fatores de

crescimento, moléculas de adesão, apoptose, regulação do ciclo celular, oncogenes e sistemas metabólicos (Hansen e Eyster, 2010).

Vários trabalhos tem focado nas diferenças da expressão gênica entre lesão endometriótica e endométrio eutópico. Há também diferenças conhecidas em expressão gênica no endométrio eutópico de mulheres com endometriose comparada com endométrio controle de mulheres sem a doença (Burney et al., 2007). Não é conhecido, entretanto, se a expressão gênica alterada no endométrio eutópico é devido a alguma diferença inerente a expressão gênica entre pacientes e controles, ou alternativamente, se a existência de lesões endometrióticas gera um ambiente peritoneal alterado que age no endométrio eutópico e então resulta em expressão gênica aberrante (Pelch et al., 2010). Assim estudos comparativos entre o endométrio de mulheres sem endometriose (controle) e o endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose podem esclarecer alterações precoces e necessárias ao desenvolvimento da doença.

O gene *ID2* (*inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein*) está mapeado na região 2p25 (Mathew et al., 1995) e altera os componentes do ciclo celular normalmente envolvidos nos mecanismos que regulam sua progressão, e sua superexpressão parece tornar células cancerosas imunes aos efeitos de inibição do crescimento de várias proteínas supressoras de tumor (Lasorella, Iavarone e Israel, 1996). A proteínas ID2 pertence a uma classe de fatores de transcrição conhecida como proteínas HLH (hélice-alça-hélice) que são uma grande família de proteínas, principalmente ativadores transcricionais, que compartilham um motivo de ligação comum, composto de uma região de amino ácido básico e uma região hélice-alça-hélice (bHLH) (Benezra et al., 1990; Norton et al., 1998).

A expressão de proteínas ID é anormal em muitos tumores, em alguns sua expressão está associada com prognóstico clínico ruim como no câncer de ovário, cervical, de próstata e no

câncer de mama (Schindl et al., 2001, Maw et al., 2008). As proteínas ID tem sido implicadas em diferentes passos na tumorigenese, diferenciação e metástase (Benezra, Rafii e Lyden, 2001; Hasskarl e Munger, 2002; Sikder et al., 2004) e pode ser considerada um oncogene (Manthey et al., 2010) A endometriose exibe alguns aspectos de malignidade tais como aumento de crescimento, vascularização e invasão tecidual, mas, características tumorais como expansão monoclonal e anomalias genéticas, permanecem indefinidas (Viganò et al., 2006). Visto as similaridades entre endometriose e câncer, mudança na expressão de genes associados com adesão celular, glicolização de proteínas, invasão celular e angiogênese talvez estejam envolvidos na patologia da endometriose como eles estão no câncer (Eyster et al., 2007). Nosso objetivo foi analisar a expressão do gene *ID2* em endométrio de mulheres sem endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual e compará-la a expressão gênica em endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose na mesma fase do ciclo menstrual.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia da Reprodução do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do mesmo hospital (nº 2204/2010) e processo HCRP nº 9699/2006 (banco de tecidos de endometriose). Todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de endométrio e lesão endometriótica de 20 pacientes com idade entre 18 e 40 anos, não menopausadas, na fase proliferativa do ciclo menstrual, sem uso de qualquer terapia hormonal há pelo menos seis meses antes da coleta, atendidas por

infertilidade e/ou dor pélvica nos ambulatórios de dor pélvica crônica (AGDP) e Infertilidade Conjugal (AEST) do HCFMRP submetidas à laparoscopia com diagnóstico laparoscópico e histológico de endometriose. As biópsias de endométrio e amostras de lesões endometrióticas peritoneais e ovarianas foram colhidas durante a laparoscopia através de Cureta de Novak. Foram avaliadas amostras teciduais pareadas de 20 mulheres, sendo 10 de endométrio de mulheres com lesão peritoneal e lesões endometrióticas peritoneais e 10 de endométrio de mulheres com endometrioma e lesões endometrióticas ovarianas. O estádio da endometriose foi determinado de acordo com a classificação da *American Society for Reproductive Medicine* (American Society for Reproductive Medicine, 1997). Das 20 biópsias de endométrio ectópico 10 eram lesões peritoniais (seis vermelhas, quatro negras), sendo três em estágio I, quatro em estágio II, duas em estágio III e uma em estágio IV e 10 corresponderam a lesões ovarianas (endometrioma ovariano) quatro em estágio III e seis em estágio IV.

Como controle foi coletado 16 amostras de endométrio de mulheres sem endometriose, padronizadas de acordo com a fase do ciclo menstrual em fase proliferativa, confirmado por critérios de datação histológica. Este grupo foi composto por pacientes com idade entre 18 e 40 anos, no menacme, que foram submetidas à laparoscopia para laqueadura tubária pelo serviço de Endoscopia Ginecológica, com confirmação laparoscópica da ausência de lesões endometrióticas, que estavam sem uso de medicação hormonal há pelo menos seis meses antes da coleta. A biópsia endometrial foi colhida através de Cureta de Novak, durante o procedimento cirúrgico.

EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

As amostras foram lavadas em solução de PBS (1x) (NaCl 8,50g/L; Na₂HPO₄ 1,11g/L; Na₂HPO₄.12H₂O 2,81g/L; KH₂PO₄ 0,20g/L pH7,0) para retirar o criopreservador dos tecidos. Em seguida, o RNA total (50mg de tecido) foi extraído com TRIZOL[®] Reagent (*Invitrogen Life Technologies*, Paisley, UK) de acordo com as instruções do fabricante. As

concentrações de RNA total foram medidas em espectrofotômetro a densidade óptica de 260nm. O RNA permanece armazenado à -80°C para procedimentos posteriores.

SÍNTESE DO CDNA

Um micrograma de RNA total de cada amostra foi transcrito reversamente usando o *High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK)* segundo as instruções do fabricante.

QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPOS REAL

As sondas e os *primers* para o gene *ID2* (Hs00747379_m1) e para os genes de referência da reação *GAPDH* (*glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase*) (Hs99999905_m1) e *ACTB* (*actin, beta*) (Hs99999903_m1) foram obtidos usando *Assay-on-Demand™ Gene Expression Products (Applied Biosystems, Warrington, UK)*, e as quantificações foram realizadas no aparelho *ABI PRISM™ 7500FAST Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Warrington, UK)*. O nível de expressão relativo foi calculado para cada amostra de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (ou 2-Ct), descrito previamente no *Applied Biosystems User Bulletin # 2* (PN 4303859) (*Applied Biosystems, Warrington, UK*). Um pool de cDNA das amostras controles foi utilizado como calibrador nas análises.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As análises estatísticas foram realizadas no *software SAS 2003* (2002-2003, *SAS Institute Inc.*, Cary, NC, USA). Aplicamos o Teste Welch's ANOVA não pareado para comparar: [1] endométrio de mulheres sem endometriose com endométrio de mulheres com endometriose; [2] estádios das lesões de mulheres com endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual. Teste T pareado para comparar as médias de expressão dos genes obtidas

entre: [3] endométrio eutópico e ectópico de 10 mulheres com endometriose peritoneal na fase proliferativa do ciclo menstrual e 10 mulheres com endometriose ovariana na mesma fase do ciclo menstrual; [4] endométrio eutópico de mulheres com endometriose e endométrio ectópico de mulheres com endometriose (lesão peritoneal + endometrioma ovariano).

RESULTADOS

A expressão do gene *ID2* no endométrio de mulheres sem endometriose é igual a expressão no endométrio eutópico de mulheres com endometriose (Figura 1).

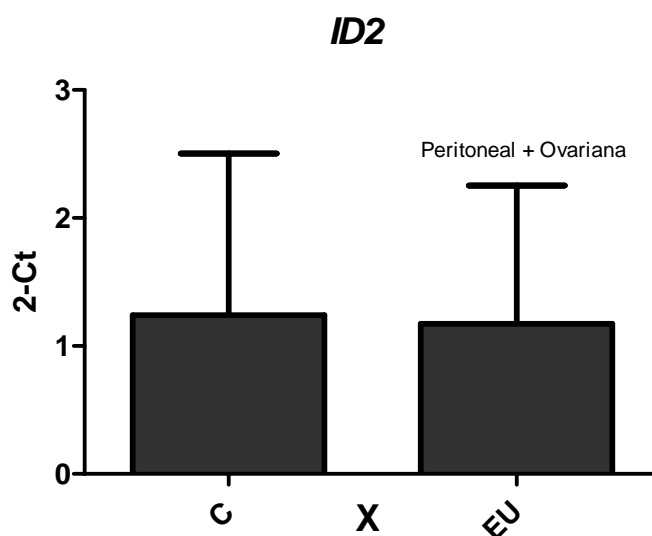


Figura 1 – Análise da expressão do gene *ID2* entre endométrio de mulheres sem endometriose com endométrio eutópico de mulheres com endometriose, sem diferença significativa para $P < 0,05$. $2-Ct = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ - quantificação relativa. C= endométrio de mulheres sem endometriose; EU= endométrio eutópico de mulheres com endometriose.

Nas amostras analisadas o gene *ID2* foi mais expresso na fase avançada (estadio III + IV) quando comparada a inicial (estadio I + II) e no endometrioma ovariano quando comparado ao endométrio eutópico de mulheres com a lesão para $P < 0,05$ (Figuras 2 e 3).

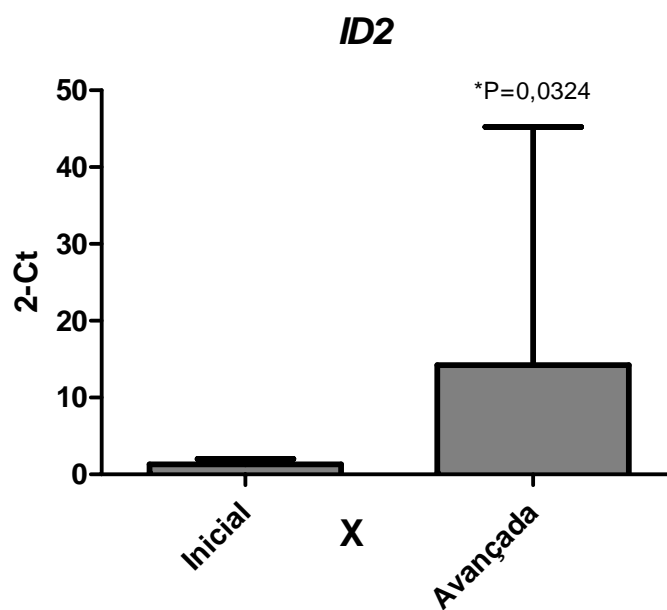


Figura 2 – Análise da expressão do gene *ID2* entre o estadio I + II (fase inicial) x estágio III + IV (fase avançada). $2-Ct = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ - método para quantificação relativa.

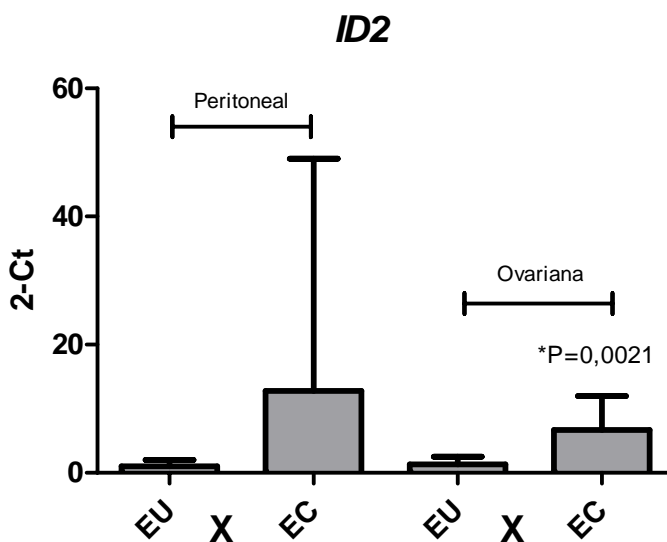


Figura 3 – Análise da expressão do gene *ID2* entre endométrio eutópico de mulheres com endometrioma ovariano e o endometrioma ovariano.. $2-Ct = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ - método para quantificação relativa. EU= endométrio eutópico de mulheres com endometriose; EC= endométrio ectópico de mulheres com endometriose.

DISCUSSÃO

Vários estudos moleculares têm sido realizados para elucidar o papel dos genes na etiologia da endometriose, no entanto, nenhum deles estudou a relação do gene *ID2* com a endometriose utilizando a técnica da PCR em tempo real. Sabemos da importância desta análise, já que o comportamento dos genes no endométrio eutópico e ectópico de mulheres com e sem endometriose pode nos ajudar a entender a base biológica desta patologia.

Não houve diferença significativa entre a expressão do gene *ID2* no endométrio de mulheres sem endometriose com o endométrio de mulheres com endometriose, este resultado é uma evidência da influência do meio peritoneal na expressão deste gene.

Em um trabalho prévio do nosso grupo que comparou endométrio eutópico com ectópico de mulheres com endometriose utilizando a técnica de hibridação subtrativa (Meola et al., 2010) este gene foi encontrado como “*up-regulated*”.

As proteínas ID alteram componentes do ciclo celular normalmente envolvidos no mecanismo que regula sua progressão (Lasorella et al., 1996; Arnold et al., 2001). Um dos genes também envolvidos na regulação do ciclo celular é o gene do retinoblastoma (*RB*), um supressor tumoral que regula negativamente o ciclo celular através da sua habilidade de se ligar ao fator de transcrição E2F e reprimir a transcrição de genes necessários para a fase S do ciclo celular (Hanahan e Weinberg, 2000). Super-expressão de *ID2* inativa pRb e também anula a atividade inibitória do ciclo celular das p107 e p130 relacionadas a pRb (Barone et al., 1994).

Goumenou et al. (2006), utilizando a técnica de imunohistoquímica analisaram se há diferença de expressão das proteínas p16, pRb e ciclina D1 em endometriomas e adenomiomas. Demonstraram que p16 e pRb tem um importante papel na regulação do crescimento celular em adenomiomas e endometriomas, respectivamente. Os nossos

resultados evidenciaram uma maior expressão do gene *ID2* nos endometriomas, e, como sua superexpressão pode inibir o papel de supressor tumoral do pRb em células cancerosas pode ser que na endometriose eles também atuem nessa mesma via.

O protooncogene *MYC* (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) codifica um fator de ligação ao DNA que pode ativar e reprimir a transcrição. Por este mecanismo, *MYC* regula a expressão de numerosos genes alvos que controlam importantes funções celulares, incluindo crescimento e progressão do ciclo celular. O gene *ID2* é um alvo do gene *MYC* (Lasorella et al., 2000), em linhagens celulares de neuroblastomas a expressão de *ID2* é induzida por N-MYC (Wang et al., 2003).

Meola et al.(2010), usando a técnica de biblioteca subtrativa identificaram 291 genes desregulados em lesões endometrióticas, entre eles o gene *MYC* foi encontrado como “*dow-regulated*” em endométrio ectópico comparado ao eutópico de mulheres com endometriose. Eles concluíram que essa desregulação pode ser responsável pela perda de homeostase nas lesões endometrióticas. Johnson et al (2005) encontraram expressão mais alta de *MYC* no endométrio eutópico de mulheres com endometriose quando comparado ao endométrio de mulheres normais. Os dados relacionados à regulação e função de *MYC* são controversos na literatura. Embora não tenhamos analisado a expressão do gene *MYC*, ele pode estar envolvido na regulação do gene *ID2* nas lesões endometrióticas avaliadas.

Este gene pode sofrer influência do meio peritoneal. O gene *ID2* está envolvido em algumas vias de regulação do crescimento e manutenção de tumores, que são características comuns a endometriose. Na endometriose pode ser que ele atue reprimindo o gene *Rb* que é um supressor tumoral. A busca incessante por mecanismos relacionados à expressão de genes presentes em comportamentos biológicos envolvidos com a etiopatogenia da doença, poderá futuramente indicar marcadores moleculares, permitindo um diagnóstico menos invasivo e com possíveis aplicações terapêuticas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as pacientes pela participação neste estudo; a equipe multidisciplinar do Grupo de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, pela coleta das amostras; e ao Laboratório de Oncologia Pediátrica do Departamento de Pediatria e Puericultura da FMRP-USP pelo suporte técnico.

BIBLIOGRAFIA

- ARNOLD, J. M., MOK, S. C., PURDLE, D., CHENEVIX-TRENCH, G. Decreased expression of the ID3 gene at 1p36.1 in ovarian adenocarcinomas. **Br. J. Cancer**, 84:352–59, 2001.
- BARONE, M. V., PEPPERKOK, R., PEVERALI, F. A., PHILIPSON, L. Id proteins control growth induction in mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91:4985–8, 1994.
- BENEZRA, R., DAVIS, R. L., LOCKSHON, D., TURNER, D. L., WEINTRAUB, H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. **Cell**, 61:49-59, 1990.
- BENEZRA, R., RAFII, S., LYDEN, D. The Id proteins and angiogenesis. **Oncogene**, 20(58):8334-41, 2001
- BURNEY, R. O., TALBI, S., HAMILTON, A. E., VO, K. C., NYEGAARD, M., NEZHAT, C. R. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. **Endocrinology**, 148:3814–26, 2007.
- CARVALHO, L., PODGAEC, S., BELLODI-PRIVATO, M., FALCONE, T., ABRÃO, M. S. Role of Eutopic Endometrium in Pelvic Endometriosis. **J Minim Invasive Gynecol**, May 25, 2011. (Epub ahead of print).
- CRAMER, D. W., MISSMER, S. A. The epidemiology of endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, 955:11–22, 2002.
- EYSTER, K. M., KLINKOVA, O., KENNEDY, V., HANSEN, K. A. Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrium. **Fertil Steril**, 88(6):1505–33, 2007.
- GIUDICE, L. C., KAO, L. C. Endometriosis. **Lancet**, 364:1789–99, 2004.
- GOUMENOU, A. G., MATALLIOTAKIS, I. M., TZARDI, M., FRAGOULI, I. G., MAHUTTE, N. G., ARICI, A. p16, retinoblastoma (pRb), and cyclin D1 protein expression in human endometriotic and adenomyotic lesions. **Fertil Steril**, Suppl 1:1204-7, 2006.

- HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100(1):57-70, 2000.(Review).
- HANSEN, K. A., EYSTER, K. M. Genetics and genomics of endometriosis. **Clin Obstet Gynecol**, 53(2):403-12, 2010.
- HASSKARL, J. e MUNGER, K. Id proteins--tumor markers or oncogenes? **Cancer Biol Ther**,1(2):91-6, 2002
- JOHNSON, M. C., TORRES, M., ALVES, A., BACALLAO, K., FUENTES, A., VEGA, M., BORIC, M. A. Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. **Reprod Biol Endocrinol**, 3:45, 2005.
- LASORELLA, A., IAVARONE, A., ISRAEL, M. A. Id2 specially alters regulation of the cell cycle by tumor suppressor proteins. **Mol. Cell. Biol.**, 16:2570-8, 1996.
- LASORELLA, A., NOSEDA, M., BEYNA, M., YOKOTA, Y. IAVARONE, A. Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. **Nature**, 407:592-8, 2000.
- LIMA, A. P., SILVA E ROSA, A. M., MOURA, M. D. Concentrações de FSH, LH, estradiol, progesterona e histamina no soro, no fluido peritonial e no fluido folicular de mulheres com e sem endometriose. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 28(11), 2006.
- MANTHEY, C., MERN, D. S., GUTMANN, A., ZIELINSKI, A. J., HERZ, C., LASSMANN, S., HASSKARL, J. Elevated endogenous expression of the dominant negative basic helix-loop-helix protein ID1 correlates with significant centrosome abnormalities in human tumor cells. **BMC Cell Biology**, 11:2, 2010
- MATHEW, S., CHEN, W., MURTY, V. V., BENEZRA, R., CHANGANTI, R. S. Chromosomal assignment of human ID1 and ID2 genes. **Genomics**, 30(2):385-7, 1995.
- MAW, M. K., FUJIMOTO, J., TAMAYA, T. Expression of the inhibitor of DNA-binding (ID)-1 protein as an angiogenic mediator in tumour advancement of uterine cervical cancers. **Br J Cancer**, 99(10):1557-63, 2008.
- MEOLA, J., ROSA E SILVA, J. C., DENTILLO, D. B., DA SILVA, W. A. JR., VEIGA-CASTELLI, L. C., BERNARDES, L. A., FERRIANI, R. A., DE PAZ, C. C., GIULIATTI, S., MARTELLI, L. Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. **Fertil Steril**, 93(6):1750-73, 2010.
- NORTON, J. D., DEED, R. W., CRAGGS, G., SABLITZSKY, F. Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. **Trends Cell. Biol.**, 8:58-65, 1998.
- PELCH, K. E., SCHRODER, A. L., KIMBAL, P. A., SHARPE-TIMMS, K. L., DAVIS, S. C. Aberrant gene expression profile in a mouse model of endometriosis mirrors that observed in women. **Fertil Steril**, 93(5):1615-27, 2010

- SAMPSON, J. A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissues into the peritoneal cavity. **Am J Obstet Gynecol**, 14:422–69, 1927.
- SCHINDL, M., OBERHUBER, G., OBERMAIR, A., SCHOPPMANN, S. F., KARNER, B., BIRNER, P. Overexpression of id-1 protein is a marker for unfavorable prognosis in early-stage cervical cancer. **Cancer Res**, 61(15):5703-06, 2001
- SIKDER, H. A., DEVLIN, M. K., DUNLAP, S., RYU, B., ALANI, R. M. Id proteins in cell growth and tumorigenesis. **Cancer Cell**, 3(6):525-30, 2004
- ULUKUS, M., CAKMAK, H., ARICI, A. The role of endometrium in endometriosis. **J Soc Gynecol Investig**, 17(7), 2006.
- ULUKUS, M., ULUKUS, E. C., TAVMERGEN GOKER, E. N., TAVMERGEN, E., ZHENG, W., ARICI, A. Expression of interleukin-8 and monocyte chemotactic protein 1 in women with endometriosis. **Fertil Steril.**, 91:687–93, 2009
- VIGANÒ, P., SOMIGLIANA, E., CHIODO, I., ABBIATI, A., VERCELLINI, P. Molecular mechanisms and biological plausibility underlying the malignant transformation of endometriosis: a critical analysis. **Hum Reprod Update**, 12:77-89, 2006.
- WANG, Q., HII, G., SHUSTERMAN, S., MOSSE, Y., WINTER, C. L., GUO, C., ZHAO, H., RAPPAPORT, E., HOGARTY, M. D., MARIS, J. M. ID2 expression is not associated with MYCN amplification or expression in human neuroblastomas. **Cancer Res**, 63:1631–5, 2003.

EXPRESSÃO AUMENTADA DOS GENES *PRELP* E *SMOC2* EM PACIENTES COM ENDOMETRIOSE

RESUMO: Endometriose é uma doença benigna, estrógeno-dependente associada com dor pélvica e infertilidade e é caracterizada pela distribuição ectópica de tecido endometrial, principalmente no peritônio pélvico e ovário. Nosso objetivo foi analisar a expressão dos genes *PRELP* e *SMOC2* em endométrio de mulheres sem endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual e compará-los a expressão gênica em endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose na mesma fase do ciclo menstrual. Foram avaliadas amostras teciduais pareadas de 20 mulheres, sendo 10 de endométrio e lesões endometrióticas peritoneais e 10 de endométrio eutópico e lesões endometrióticas ovarianas na fase proliferativa do ciclo menstrual. Como controle (C) foi coletado 16 amostras de endométrio de mulheres sem endometriose, na mesma fase do ciclo menstrual. A análise da expressão foi feita através da PCR em tempo real. Nas análises realizadas com todas as lesões endometrióticas juntas o *SMOC2* foi mais expresso na lesão (peritônio e ovário) quando comparado ao endométrio de mulheres com endometriose. Já quando a análise foi realizada separando-se as lesões, o gene *PRELP* foi mais expresso na lesão peritoneal. Não houve diferença significativa na expressão dos genes *PRELP* e *SMOC2* entre o endométrio de mulheres sem endometriose e o endométrio de mulheres com endometriose, e também quando se analisou os estádios da endometriose. Acredita-se que o ambiente peritoneal possa influenciar na expressão destes genes na endometriose. É possível que a desregulação dos genes estudados permita o desenvolvimento e manutenção do tecido ectópico, pois estes genes participam de forma direta ou indireta em processos celulares relacionados à arquitetura do citoesqueleto, e que alterações na homeostase celular podem levar a características de migração celular, angiogênese e invasão inapropriadas.

INTRODUÇÃO

Endometriose é uma doença benigna, estrógeno-dependente associada com dor pélvica e infertilidade e é caracterizada pela distribuição ectópica de tecido endometrial, principalmente no peritônio pélvico e ovário (Eskenazi e Warner, 1997). Ela afeta de 10 a 15 % das mulheres em idade reprodutiva e, 35 a 50% das mulheres com infertilidade, dor pélvica ou ambos (Cramer e Missmer, 2002; Giudice e Kao, 2004).

Acredita-se primariamente que a endometriose ocorra devido à menstruação retrógrada e implante de células endometriais na cavidade abdominal (Sampson, 1927). Entretanto, algumas características moleculares parecem favorecer o início e progressão da implantação ectópica e talvez explique porque somente algumas mulheres desenvolvem a doença (Viganò et al., 2006). Na última década, vários estudos de perfil de expressão gênica tem demonstrado que muitos genes são desregulados na endometriose (Guo, 2009). A identificação de diferenças molecular no endométrio eutópico de mulheres com endometriose é um importante passo no entendimento da patogenese e para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento da infertilidade e dor associada (Burney et al., 2009).

A etiologia da endometriose envolve fatores que influenciam no seu estabelecimento e progressão, incluindo hormonais (Nyholt et al., 2009), imunes (Weiss et al., 2009), alterações ambientais (Guo, 2009) e predisposição genética (Juo et al., 2006) e apesar de ser uma das doenças mais estudadas em ginecologia (Ulukus et al., 2009), sua etiologia ainda não está clara e várias são as teorias atuais para explicá-la (Carvalho et al., 2011).

Vários trabalhos tem focado nas diferenças da expressão gênica entre lesão endometriótica e endométrio eutópico. Há também diferenças conhecidas em expressão gênica no endométrio eutópico de mulheres com endometriose comparada com endométrio controle de mulheres sem a doença (Burney et al., 2007). Não é conhecido, entretanto, se a

expressão gênica alterada no endométrio eutópico é devido a alguma diferença inerente a expressão gênica entre pacientes e controles, ou alternativamente, se a existência de lesões endometrióticas gera um ambiente peritoneal alterado que age no endométrio eutópico e então resulta em expressão gênica aberrante (Pelch et al., 2010). Assim estudos comparativos entre o endométrio de mulheres sem endometriose (controle) e o endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose podem esclarecer alterações precoces e necessárias ao desenvolvimento da doença.

A busca incessante por mecanismos relacionados à expressão de genes presentes em comportamentos biológicos envolvidos com a etiopatogenia da doença, poderá futuramente indicar marcadores moleculares, permitindo um diagnóstico menos invasivo e com possíveis aplicações terapêuticas.

Em humanos, o gene *PRELP* [(proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein)] está mapeado no cromossomo 1q32 sendo codificado por três éxons (Grover et al., 1996). Tal gene codifica a proteína prolargina que é rica em leucina e apresenta uma região amino-terminal rica em resíduos de prolina e arginina (Bengtsson et al., 2002). Uma das principais características desta proteína é sua localização relativamente restrita aos tecidos cartilagosos, onde sua expressão é abundante no adulto e deficiente no feto e recém-nascido (Melching e Roughley, 1990; Grover et al., 1996). Além da cartilagem, o gene *PRELP* foi encontrado expresso em outros tecidos tais como rim, pele e tendão (Heinegard et al., 1986).

Este gene pertence a uma família de proteínas de repetição rica em leucina (LRR) (Kobe e Deisenhofer, 1994). As LRR dos tecidos conectivos provavelmente agem na regulação da montagem da matriz e fornecem ligações entre as principais estruturas constituintes (Iozzo, 1997; Hocking, Shinomura e McQuillan, 1998). A presença de 10 repetições centrais ricas em leucina coloca o *PRELP* na mesma sub-família das pequenas proteoglicanas ricas em leucina (SLRPs) – decorin, biglican, fibromodulin, lumican e

keratocan (Iozzo e Murdoch, 1996; Hocking et al., 1998). O envolvimento dos membros desta família na fibrilogênese do colágeno, crescimento celular, diferenciação e migração revelam sua importância na modelagem da matriz extracelular (Tasheva, Klocke e Conrad, 2004).

Baseado nesta estrutura, PRELP talvez funcione como uma molécula de ligação na matriz, interagindo com outras proteínas da matriz extracelular através dos seus LRRs e com glicosaminoglicanos através de seu domínio amino-terminal. Desde que muitas células contem sulfato de heparina na sua superfície, PRELP pode ligar as células à matriz (Heinegard et al., 1986; Sommarin e Heinegard, 1989).

O gene *SMOC2* [(*SPARC related modular calcium binding 2*)] humano foi descrito, em 2002, com o nome de *Smap2* (*smooth muscle associated protein 2*) associado com músculo liso e super expresso durante a formação da neointima em rato (Nishimoto et al., 2002). Sua estrutura foi elucidada por análise de um *contig* (sequências sobrepostas de DNA) (NT 007302) originária de uma seqüência do cromossomo 6. Este gene está mapeado no 6q27 e abrange cerca de 226kb. Sua região codificadora consiste de 13 éxons. Cada domínio do *SMOC2* é codificado por um ou mais éxons e os limites do domínio coincidem com locais de *splicing* (Vannahme et al., 2003).

Este gene é expresso principalmente na matriz extracelular e codifica a proteína matricelular *SMOC2* que pertence à família da proteína *SPARC* (*secreted protein, acidic, cysteine-rich*), altamente expressa durante a embriogênese e na cicatrização *SMOC2* é expresso em quase todos os tecidos, sendo mais expresso no coração, músculo liso, baço e ovário (Vannahme et al., 2003; Rocnik et al., 2006).

Proteínas matricelulares influenciam uma variedade de funções celulares incluindo sinalização de fator de crescimento, migração, adesão, cicatrização, angiogênese e proliferação celular. A proteína *SMOC2* promove a montagem da matriz e pode estimular a

proliferação e a migração de células endoteliais, bem como atividade de angiogênese (Sage et al., 2003; Rocnik et al., 2006).

Estudos *in vitro* mostram que SMOC2 interage com integrinas $\alpha\beta1$ e $\alpha\beta6$ (Maier et al., 2008) e mantém a integrina ligada a quinase (ILK – *integrin linked kinase*) ativa durante a fase G1 do ciclo celular, contribuindo para a progressão do mesmo (Liu et al., 2008).

Estes dados sugerem que *SMOC2* pode mediar a interação entre integrinas e a matriz extracelular e contribuir para sinalização do seu efector intracelular, ILK. Outros ensaios mostram que *SMOC2* media os efeitos mitogênicos e angiogênicos de VEGF, PDGF e FGF, sugerindo assim que *SMOC2* pode mediar interações entre estes fatores de crescimento e seus receptores, ou agir em paralelo, via sinérgica (Rocnik et al., 2006; Liu et al., 2008).

A análise da expressão dos genes estudados ainda não foi realizada através da técnica de PCR em tempo real em lesões endometrióticas, bem como em endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual. A proliferação das células endometrióticas deve ocorrer para que as mesmas cresçam e se estabilizem, entretanto, não está claro se há diferenças na proliferação entre lesões endometrióticas e tecido eutópico (Wingfield et al., 1995; Nisolle, Casanas-Roux e Donnez, 1997). O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão dos genes *PRELP* e *SMOC2* em endométrio de mulheres sem endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual e compará-la a expressão gênica em endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose na mesma fase do ciclo menstrual.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia da Reprodução do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de

Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do mesmo hospital (nº 2204/2010) e processo HCRP nº 9699/2006 (banco de tecidos de endometriose). Todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de endométrio e lesão endometriótica de 20 pacientes com idade entre 18 e 40 anos, não menopausadas, na fase proliferativa do ciclo menstrual, sem uso de qualquer terapia hormonal há pelo menos seis meses antes da coleta, atendidas por infertilidade e/ou dor pélvica nos ambulatórios de dor pélvica crônica (AGDP) e Infertilidade Conjugal (AEST) do HCFMRP submetidas à laparoscopia com diagnóstico laparoscópico e histológico de endometriose. As biópsias de endométrio e amostras de lesões endometrióticas peritoneais e ovarianas foram colhidas durante a laparoscopia através de Cureta de Novak. Foram avaliadas amostras teciduais pareadas de 20 mulheres, sendo 10 de endométrio de mulheres com lesão peritoneal e lesões endometrióticas peritoneais e 10 de endométrio de mulheres com endometrioma e lesões endometrióticas ovarianas. O estádio da endometriose foi determinado de acordo com a classificação da *American Society for Reproductive Medicine* (American Society for Reproductive Medicine, 1997). Das 20 biópsias de endométrio ectópico 10 eram lesões peritoneais (seis vermelhas, quatro negras), sendo três em estágio I, quatro em estágio II, duas em estágio III e uma em estágio IV e 10 corresponderam a lesões ovarianas (endometrioma ovariano) quatro em estágio III e seis em estágio IV.

Como controle foi coletado 16 amostras de endométrio de mulheres sem endometriose, padronizadas de acordo com a fase do ciclo menstrual em fase proliferativa, confirmado por critérios de datação histológica. Este grupo foi composto por pacientes com idade entre 18 e 40 anos, no menacme, que foram submetidas à laparoscopia para laqueadura tubária pelo serviço de Endoscopia Ginecológica, com confirmação laparoscópica da ausência

de lesões endometrióticas, que estavam sem uso de medicação hormonal há pelo menos seis meses antes da coleta. A biópsia endometrial foi colhida através de Cureta de Novak, durante o procedimento cirúrgico.

EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

As amostras foram lavadas em solução de PBS (1x) (NaCl 8,50g/L; Na₂HPO₄ 1,11g/L; Na₂HPO₄.12H₂O 2,81g/L; KH₂PO₄ 0,20g/L pH7,0) para retirar o criopreservador dos tecidos. Em seguida, o RNA total (50mg de tecido) foi extraído com TRIZOL[®] Reagent (*Invitrogen Life Technologies*, Paisley, UK) de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de RNA total foram medidas em espectrofotômetro a densidade óptica de 260nm. O RNA permanece armazenado à -80⁰C para procedimentos posteriores.

SÍNTESE DO CDNA

Um micrograma de RNA total de cada amostra foi transcrito reversamente usando o *High Capacity cDNA Archive Kit* (*Applied Biosystems*, Warrington, UK) segundo as instruções do fabricante.

QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPOS REAL

As sondas e os *primers* para os genes *PRELP* (Hs00160431_m1), *SMOC2* (Hs00405777_m1) e para os genes de referência da reação *GAPDH* (*glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase*) (Hs99999905_ml) e *ACTB* (*actin, beta*) (Hs99999903_ml) foram obtidos usando *Assay-on-Demand™ Gene Expression Products* (*Applied Biosystems*, Warrington, UK), e as quantificações foram realizadas no aparelho *ABI PRISM™ 7500FAST Sequence Detection Systems* (*Applied Biosystems*, Warrington, UK). O nível de expressão relativo para os genes analisados foi calculado para cada amostra de acordo com o método de

$2^{-\Delta\Delta CT}$ (ou 2-Ct), descrito previamente no *Applied Biosystems User Bulletin #2* (PN 4303859) (*Applied Biosystems, Warrington, UK*). Um pool de cDNA das amostras controles foi utilizado como calibrador nas análises.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As análises estatísticas foram realizadas no *software* SAS 2003 (2002-2003, *SAS Institute Inc., Cary, NC, USA*). Aplicamos o Teste Welch's ANOVA não pareado para comparar: [1] endométrio de mulheres sem endometriose com endométrio de mulheres com endometriose; [2] estádios das lesões de mulheres com endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual. Teste T pareado para comparar as médias de expressão dos genes obtidas entre: [3] endométrio eutópico e ectópico de 10 mulheres com endometriose peritoneal na fase proliferativa do ciclo menstrual e 10 mulheres com endometriose ovariana na mesma fase do ciclo menstrual; [4] endométrio eutópico de mulheres com endometriose e endométrio ectópico de mulheres com endometriose (lesão peritoneal + endometrioma ovariano). Todos os testes foram realizados conforme os procedimentos GLM.

RESULTADOS

Não houve diferença significativa entre a expressão dos genes *PRELP* e *SMOC2* no endométrio de mulheres sem endometriose com o endométrio eutópico de mulheres com endometriose (Figura 1).

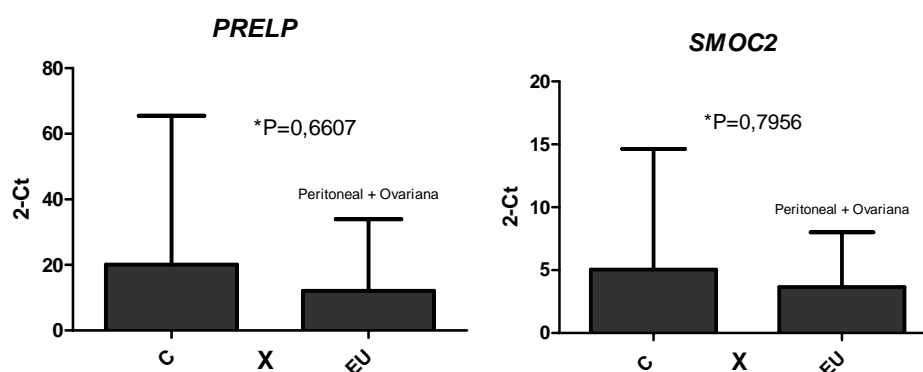


Figura 1 – Análise da expressão dos genes *PRELP* e *SMOC2* entre endométrio de mulheres sem endometriose com endométrio eutópico de mulheres com endometriose, sem diferença significativa para $P < 0,05$. $2-Ct = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ - quantificação relativa. C= endométrio de mulheres sem endometriose; EU= endométrio eutópico de mulheres com endometriose.

A análise das amostras pareadas resultou em uma maior expressão do gene *PRELP* na lesão peritoneal com $P < 0,05$ comparada ao endométrio eutópico de mulheres com endometriose peritoneal (Figura 2).

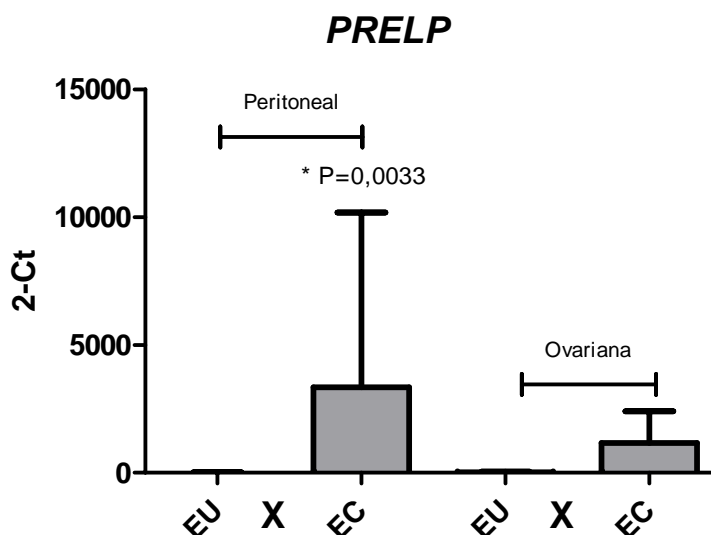


Figura 2 – Análise da expressão do gene *PRELP* entre endométrio eutópico de mulheres com endometriose peritoneal e o endométrio ectópico. $2-Ct = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ - método para quantificação relativa. EU= endométrio eutópico de mulheres com endometriose EC= endométrio ectópico de mulheres com endometriose.

DISCUSSÃO

Estudos comparativos da expressão gênica entre o endométrio de mulheres sem endometriose (controle) e o endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose são importantes para identificar se o aumento da expressão gênica já está presente no endométrio dessas mulheres ou se essa expressão só é alterada quando este tecido cai na cavidade peritoneal e adquire um potencial para se transformar em lesões endometrióticas.

Não houve diferença significativa entre a expressão dos genes *PRELP* e *SMOC2* no endométrio de mulheres sem endometriose com o endométrio eutópico de mulheres com endometriose. Este resultado é uma evidência da influência do meio peritoneal na expressão destes genes.

O gene *PRELP* faz parte da família das pequenas proteoglicanas ricas em leucina e estas macromoléculas tem papéis cruciais na montagem da matriz extracelular (Hocking; Shinomura e McQuillan, 1998; Ameye e Young, 2002). Proteínas da matriz (colágeno, fibronectina, laminin) são responsáveis pela sinalização relacionada à proliferação (Bates; Lincz e Burns, 1995), migração (Iivanainen et al., 2003), diferenciação (Watt, 2002) ou apoptose (Hock et al., 2001) de muitos tipos de células durante o processo fisiológico e patológico (Kupiec-Weglinski et al., 1993 Pupa et al., 2002). Isto sugere que na endometriose proteínas da matriz talvez sejam responsáveis por atrapalhar tais funções fisiológicas do endométrio como secreção (Gottschalk et al., 2000), implantação (Selam et al., 2002) e menstruação (Abrahamson et al., 1986; Koks et al., 2000).

Zhao et al. (2011), examinaram a presença de SNPs próximos aos alvos de 22 miRNA, previamente estudados por Ohlsson Teague et al (2009), dentre os 102 SNPs analisados em mulheres com endometriose e controle, o SNP para o gene *PRELP* (rs7542469) foi encontrado no grupo controle, não sendo relacionado com a endometriose. Embora na

literatura prévia o gene *PRELP* não esteja relacionado a endometriose, nossos resultados da análise da expressão por PCR em tempo real, demonstraram uma maior expressão deste gene em lesões peritoneais. Este resultado pode estar relacionado a alterações no ambiente peritoneal responsáveis pela transformação do endométrio em lesão endometriótica.

Nas análises realizadas com todas as lesões endometrióticas juntas, o gene *SMOC2* foi mais expresso na lesão (endometrioma e peritoneal) quando comparado ao endométrio eutópico de mulheres com endometriose

Este resultado corrobora com os achados por Eyster e et al. (2007) que analisaram o modelo de expressão gênica em endométrio ectópico e eutópico de 11 pacientes para identificar possíveis famílias de genes envolvidas na endometriose. Neste screening, dos 717 genes analisados, o gene *SMOC2*, dentre outros, foi encontrado como mais expresso nas lesões endometrióticas (endometrioma e peritoneal) em relação ao endométrio eutópico. Visto que a PCR em tempo real é o padrão ouro para quantificação de expressão gênica é possível que o *SMOC2* possa estar relacionado a vias de desenvolvimento da endometriose participando diretamente do desenvolvimento da mesma.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as pacientes pela participação neste estudo; a equipe multidisciplinar do Grupo de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, pelas coleta das amostras; e ao Laboratório de Oncologia Pediátrica do Departamento de Pediatria e Puericultura da FMRP-USP pelo suporte técnico.

BIBLIOGRAFIA

ABRAHAMSON, D. R. Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. **J Pathol**, 149:267–78, 1986.

AMEYE, L. e YOUNG, M. F. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. **Glycobiology**, 12:107R-16R, 2002.

BENGTSSON, E., MÖRGELIN, M., SASAKI, T., TIMPL, R., HEINEGÅRD, D., ASPBERG, A. The leucine-rich repeat protein PRELP binds perlecan and collagens and may function as a basement membrane anchor. **J Biol Chem**, 277:15061–8, 2002.

BURNEY, R. O., TALBI, S., HAMILTON, A. E., VO, K. C., NYEGAARD, M., NEZHAT, C. R. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. **Endocrinology**, 148:3814–26, 2007.

BURNEY, R. O., HAMILTON, A. E., AGHAJANOVA, L., VO, K. C., NEZHAT, C. N., LESSEY, B. A., GIUDICE, L. C. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. **Molecular Human Reproduction**, 15(10):625–31, 2009.

CARVALHO, L., PODGAEC, S., BELLODI-PRIVATO, M., FALCONE, T., ABRÃO, M. S. Role of Eutopic Endometrium in Pelvic Endometriosis. **J Minim Invasive Gynecol**, May 25, 2011. (Epub ahead of print).

CRAMER, D. W., MISSMER, S. A. The epidemiology of endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, 955:11–22, 2002.

ESKENAZI, B., WARNER, M. L. Epidemiology of endometriosis. **Obstet Gynecol Clin North Am**, 24(2):235–58, 1997.

EYSTER, K. M., KLINKOVA, O., KENNEDY, V., HANSEN, K. A. Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrium. **Fertil Steril**, 88(6):1505–33, 2007.

GIUDICE, L. C., KAO, L. C. Endometriosis. **Lancet**, 364:1789–99, 2004.

GROVER, J., CHEN, X-N., KORENBERG, J. R., RECKLIES, A. D., ROUGHLEY, P. J. The gene organization, chromosome location, and expression of a 55-kDa matrix protein (PRELP) of human articular cartilage. **Genomics**, 38:109-117, 1996

GUO, S. W. Epigenetics of endometriosis. **Mol Hum Reprod**, 15:587-607, 2009

HEINEGÅRD, D., LARSSON, T., SOMMARIN, Y., FRANZEN, A., PAULSSON, M., HEDBOM, E. Two novel matrix proteins isolated from articular cartilage show wide distributions among connective tissues. **J. Biol. Chem**, 261:13866–72, 1986

HOCK, J. M., KRISHNAN, V., ONYIA, J. E., BIDWELL, J. P., MILAS, J., STANISLAUS, D. Osteoblast apoptosis and bone turnover. **J Bone Miner Res**, 16:975–84 (Review), 2001.

- HOCKING, A. M., SHINOMURA, T., MCQUILLAN, D. J. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. **Matrix Biol**, 17:1–19, 1998.
- IIVANAINEN, E., KAHARI, V. M., HEINO, J., ELENIUS, K. Endothelial cell-matrix interactions. **Microsc Res Tech**, 60:13–22 (Review), 2003.
- IOZZO, R. V. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol**, 32:141–74, 1997
- IOZZO, R. V., MURDOCH, A. D. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. **FASEB J**, 10(5):598-614, 1996.
- JUO, S. H., WANG, T. N., LEE, J. N., WU, M. T., LONG, C. Y., TSAI, E. M. CYP17, CYP1A1 and COMT polymorphisms and the risk of adenomyosis and endometriosis in Taiwanese women. **Hum Reprod**, 21(6):1498-502, 2006.
- KOBE, B., DEISENHOFER, J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. **Trends Biochem Sci**, 19(10):415-21, 1994
- KOKS, C. A., GROOTHUIS, P. G., DUNSELMAN, G. A., DE GOEIJ, A. F., EVERS J. L. Adhesion of menstrual endometrium to extracellular matrix: the possible role of integrin alpha(6)beta(1) and laminin interaction. **Mol Hum Reprod**, 6:170–7, 2000.
- KUPIEC-WEGLINSKI, J. W., HEEMANN, U. W., COITO, A. J., TULLIUS, S. G., TILNEY, N. L., DE SOUSA, M. Adhesion molecule interaction with extracellular matrix. **Exp Nephrol**, 1:78–82, 1993.
- LIU, P., LU, J., CARDOSO, W. V., VAZIRI, C. The SPARC-related factor SMOC-2 promotes growth factor-induced cyclin D1 expression and DNA synthesis via integrin-linked kinase. **Mol Biol Cell**, (1):248-61, 2008.
- MAIER, S., PAULSSON, M., HARTMANN, U. The widely expressed extracellular matrix protein SMOC-2 promotes keratinocyte attachment and migration. **Exp Cell Res**, 314(13):2477-87, 2008.
- MELCHING, L. I., ROUGHLEY, P. J. A matrix protein of Mr 55,000 r that accumulates in human articular cartilage with age. **Biochim. Biophys. Acta**, 1036:213-20, 1990.
- NISHIMOTO, S., HAMAJIMA, Y., TODA, Y., TOYODA, H., KITAMURA, K., KOMURASAKI, T. Identification of a novel smooth muscle associated protein, smap2, upregulated during neointima formation in a rat carotid endarterectomy model **Biochimica et Biophysica Acta**, 1576:225– 230, 2002.
- NISOLLE, M., CASANAS-ROUX, F., DONNEZ, J. Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis. **Fertil Steril**, 68:912–9, 1997.
- NYHOLT, D. R., GILLESPIE, N. G., MERIKANGAS, K. R., TRELOAR, S. A., MARTIN, N. G., MONTGOMERY, G. W. Common genetic influences underlie comorbidity of migraine and endometriosis. **Genet Epidemiol**, 33:105-13, 2009.

- OHLSSON TEAGUE, E. M., VAN DER HOEK, K. H., VAN DER HOEK, M. B., PERRY, N., WAGAARACHCHI, P., ROBERTSON, S. A., PRINT, C. G., HULL, L. M. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. **Mol Endocrinol**, 23(2):265-75, 2009.
- PELCH, K. E., SCHRODER, A. L., KIMBAL, P. A., SHARPE-TIMMS, K. L., DAVIS, S. C. Aberrant gene expression profile in a mouse model of endometriosis mirrors that observed in women. *Fertil Steril*, 93(5):1615-27, 2010.
- PUPA, S. M., MENARD, S., FORTI, S., TAGLIABUE, E. New insights into the role extracellular matrix during tumor onset and progression. **J Cell Physiol**, 192:259–67, 2002.
- ROCNIK, E. F., LIU, P., SATO, K., WALSH, K., VAZIRI, C. The novel SPARC family member SMOC-2 potentiates angiogenic growth factor activity. **J Biol Chem**, 281(32):22855-64, 2006.
- SAGE, E. H., REED, M., FUNK, S. E., TRUONG, T., STEADELE, M., PUOLAKKAINEN, P., MAURICE, D. H., BASSUK, J. A. Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metalloproteinase 3 produces polypeptides that influence angiogenesis. **J Biol Chem**, 278(39):37849–57, 2003.
- SAMPSON, J. A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissues into the peritoneal cavity. **Am J Obstet Gynecol**, 14:422–69, 1927.
- SOMMARIN, Y., LARSSON, T., HEINEGÅRD, D. Chondrocyte-matrix interactions. Attachment to proteins isolated from cartilage. **Exp Cell Res**, 184(1):181-92, 1989
- TASHEVA, E.S., KLOCKE, B., CONRAD, G.W. Analysis of transcriptional regulation of the small leucine rich proteoglycans. **Mol Vis**, 10:758–72, 2004.
- ULUKUS, M., ULUKUS, E. C., TAVMERGEN GOKER, E. N., TAVMERGEN, E., ZHENG, W., ARICI, A. Expression of interleukin-8 and monocyte chemotactic protein 1 in women with endometriosis. **Fertil Steril.**, 91:687–93, 2009.
- VANNAHME, C., GOSLING, S., PAULSSON, M., MAURER, P., HARTMANN, U. Characterization of SMOC-2, a modular extracellular calcium-binding protein. **Biochem J**, 373:805–14, 2003.
- VIGANÒ, P., SOMIGLIANA, E., CHIODO, I., ABBIATI, A., VERCELLINI, P. Molecular mechanisms and biological plausibility underlying the malignant transformation of endometriosis: a critical analysis. **Hum Reprod Update**, 12:77-89, 2006.
- WINGFIELD, M., MACPHERSON, A., HEALY, D. L., ROGERS, P. A. Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. **Fertil Steril**, 64:340–6, 1995
- WANG, Q., HUI, G., SHUSTERMAN, S., MOSSE, Y., WINTER, C. L., GUO, C., ZHAO, H., RAPPAPORT, E., HOGARTY, M. D., MARIS, J. M. ID2 expression is not associated with MYCN amplification or expression in human neuroblastomas. **Cancer Res**, 63:1631–5, 2003.

WATT, F. M. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. **EMBO J**, 21:3919–26 (Review), 2002.

WEISS, G., GOLDSMITH, L. T., TAYLOR, R. N., BELLET, D., TAYLOR, H. S. Inflammation in reproductive disorders. **Reprod Sci**, 16:216-29, 2009.

ZHAO, Z. Z., CROFT, L., NYHOLT, D. R., CHAPMAN, B., TRELOAR, S. A., HULL, M. L., MONTGOMERY, G. W. Evaluation of polymorphisms in predicted target sites for micro RNAs differentially expressed in endometriosis. **Mol Hum Reprod**, 17(2):92-103, 2011.