

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**  
**Instituto de Biociências**

**DANIELA ZIMBARDI**

**IDENTIFICAÇÃO DE PERFIS DIFERENCIAIS DE  
METILAÇÃO DO DNA NA ENDOMETRIOSE**

**Botucatu - SP**

**2010**

**DANIELA ZIMBARDI**

**Identificação de perfis diferenciais de metilação do DNA na  
endometriose**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" –  
UNESP, como requisito à obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas – Área de  
concentração: Genética.*

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cláudia Aparecida Rainho

BOTUCATU – SP  
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Zimbardi, Daniela.

Identificação de perfis diferenciais de metilação do DNA na endometriose / Daniela Zimbardi. - Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Cláudia Aparecida Rainho

Assunto CAPES: 20200005

1. Genética. 2. Endometriose. 3. Microarranjos de DNA.

Palavras-chave: Endometriose; Ilha CpG; Metilação; Microarray; MS-AP-PCR.

*"O que fazemos para nós, morre conosco. O que fazemos pelos outros  
e pelo mundo, continua e é imortal."*

*(Albert Pine)*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pessoas batalhadoras cujo exemplo sempre seguirei, pelo apoio e interesse sempre demonstrados durante minha ausência.

À Alexandre Domingues, o amor da minha vida, pelo incentivo, companheirismo e incontáveis risadas e que me conquistou com o seu coração imenso e pela pessoa maravilhosa que é.

À minha orientadora Dra. Cláudia Aparecida Rainho, presente desde o início de minha vida acadêmica, pelos valiosos ensinamentos, pelo apoio e motivação constantes ao longo destes anos de parceria, além da confiança e reconhecimento que sempre demonstrou por mim.

Ao Dr. Maurício Abrão, por nos ceder as amostras para a realização deste estudo e pelo interesse sempre demonstrado, juntamente com a sua equipe.

À Dra. Sílvia Rogatto, por ceder a infra-estrutura de seu laboratório durante o desenvolvimento do presente estudo, pela ajuda e interesse demonstrados quanto ao andamento e conclusão dos dados.

À Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis do Depto. de Farmacologia da UNIFESP e Dra. Lígia da Veiga Pereira do Instituto de Biociências da USP, pelo interesse demonstrado pelo estudo, e especialmente à Dra. Lígia por gentilmente ter cedido as linhagens HCT116 e DKO.

À Dra. Daisy Salvadori e à Dra. Glenda pelo empréstimo das câmaras de hidratação para as lâminas de *microarray*.

À Ana Carolina Poppe (Excedente) pela coleta das amostras e dados das pacientes, além de sempre estar pronta a me ajudar em todas as minhas idas a São Paulo; e à patologista Annacarolina Silva, pelas análises histopatológicas das amostras.

Ao patologista Alexandre Fabro pela enorme colaboração na delimitação das lesões endometrióticas nas amostras e no desenvolvimento do protocolo de microdissecção manual, sempre atencioso e curioso pelos resultados do trabalho.

Ao Dr. Jomar Monteiro, pela colaboração durante a análise das lâminas de *microarray* e por aceitar compor a minha banca de qualificação.

Aos técnicos do Depto. de Patologia, Zé Carlos e Ronaldo, pela confecção das lâminas histológicas e pelo auxílio no procedimento de microdissecção manual.

À Cássia pelo grande apoio durante a realização de etapas cruciais deste trabalho, juntamente com Priscila, Sara, Ariane, Francine e Fábio, que estavam sempre prontos a me auxiliar, além de todos os demais do laboratório Neogene, pela receptividade.

Às companheiras de laboratório, Érika, Joana, Priscila e Gimena (não mais em nosso grupo) pela amizade, ajuda e estímulo, juntamente com Vinícius e a estagiária Isabele, pelo interesse sempre demonstrado e colaboração quanto à realização de algumas etapas, e Natália, por manter a ordem do ambiente de trabalho, indispensável para a realização deste e de todos os demais projetos de pesquisa. Enfim, pelos agradáveis momentos compartilhados.

À grande amiga e conselheira Priscilla, por sempre me receber de braços abertos e permitir a minha estadia em sua casa tantas e tantas vezes.

Aos amigos que mesmo distantes, sempre se fizeram presentes, em especial à Janaína Martorini.

Àqueles que não estão mais conosco, mas que nos acompanharão por toda a vida.

Aos colegas de Pós-Graduação e funcionários do Depto de Genética e Seção de Pós-Graduação, pela amizade e troca de experiências, e por deixarem o ambiente de trabalho mais prazeroso.

À Comissão Examinadora, pela disponibilidade e pelas críticas, sugestões e comentários que sem dúvida em muito contribuirão para que eu continue me empenhando na carreira acadêmica.

Às pacientes que aceitaram fazer parte desse estudo, sem as quais nada do que fazemos teria sentido.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa e auxílio financeiro concedidos.

## LISTA DE ABREVIATURAS

*Devido ao grande número de genes listados neste estudo, os mesmos não serão relacionados nesta lista. Foram considerados os símbolos oficiais dos genes conforme recomendações do Guidelines for Human Gene Nomenclature (<http://www.genenames.org/guidelines.html>).*

7'-deaza-dGTP	7-deaza-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
ATP	Trifosfato de adenosina
BLAT	<i>Basic Local Alignment Tool</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina de soro bovino
BWS	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
CA125	<i>Cancer-antigen 125</i>
CHARM	<i>Comprehensive High throughput Arrays for Relative Methylation</i>
COBRA	<i>Combined Bisulfite Restriction Analysis</i>
Cy3/Cy5	Cianina 3/Cianina 5
DKO	Linhagem celular de câncer colorretal nocaute para DNMT1 e DNMT3B
DMH	<i>Differential Methylation Hybridization</i>
DMR	<i>Differentially Methylated Region</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA metiltransferase
dNTP	Dinucleotídeos trifosfatados
DLRSD	<i>Derivative Log Ratio Standard Deviation</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EU/EC	Eutópico/Ectópico
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>
GTP	Trifosfato de guanosina
HATs	Acetilases de histonas
HCT116	Linhagem celular de câncer colorretal
HDACs	Desacetilases de histonas
HELP	<i>HpaII tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR</i>
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
LB	Lysogeny Broth
LCM	Microdissecção a laser
LINES	<i>Long interspersed elements</i>
MCAM	<i>Methylated CpG island Amplification Microarray</i>
MMASS	<i>Microarray-based Methylation Assessment of Single Samples</i>
MS-AP-PCR	<i>Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed PCR</i>
MSP	<i>Methylation Specific-PCR</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polietilenoglicol
PTP	Proteína tirosina fosfatase
RNA	Ácido ribonucléico
SAM	S-adenosil metionina
SDS	Dodecilo sulfato de sódio
SINES	<i>Short interspersed elements</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TRX	Tioredoxina
UCSC	<i>University of California Santa Cruz</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
USP	Universidade de São Paulo
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- -D- galactopiranosídeo



## ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	17
Epigenética.....	18
Endometriose.....	21
Epigenética da Endometriose .....	25
Estratégias para a Identificação do Metiloma Humano .....	30
OBJETIVOS .....	36
MATERIAL E MÉTODOS .....	36
A) Identificação dos perfis diferenciais de metilação do DNA na endometriose baseada na triagem genômica de microarranjos de ilhas CpG.....	39
A.1 Amostras .....	39
A.2 Microdissecção manual .....	41
A.3 Obtenção do DNA genômico .....	43
A.4 Triagem de ilhas CpG diferencialmente metiladas pela análise de microarranjos de Ilhas CpG .....	44
A.4.1 Digestão com <i>Mse</i> I e Ligação de Adaptadores .....	46
A.4.2. Representação da metilação diferencial.....	46
A.4.3 Amplificação pela PCR.....	47
A.4.4. Marcação dos fragmentos de DNA.....	48
A.4.5 Preparação do DNA genômico marcado para hibridação.....	50
A.4.6 Hibridação na plataforma <i>Agilent Technologies' Human CpG Island ChIP-on-Chip Set 244K</i> .....	51
A.4.7 Análise das lâminas .....	52
A.4.8 Análise de metilação do DNA nas linhagens de câncer de cólon HCT116 e DKO..	54
B) Identificação dos perfis diferenciais de metilação do DNA na endometriose baseada na estratégia de MS-AP-PCR (Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed PCR.....	55
B.1 MS-AP-PCR ( <i>Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction</i> ) .....	55
B.2 Recuperação de bandas diferencialmente metiladas a partir de géis de poliacrilamida .	57
B.3 Clonagem.....	57
B.4 Sequenciamento.....	59
B.5 Confirmação dos dados de MS-AP-PCR por sequenciamento do DNA modificado pelo bissulfito de sódio .....	60
B.5.1 Modificação do DNA pelo bissulfito de sódio.....	60
B.5.2 Análise do padrão metilação do gene <i>COL6A2</i> .....	62
RESULTADOS .....	64

A) Identificação dos perfis diferenciais de metilação do DNA na endometriose baseada na triagem genômica de microarranjos de ilhas CpG.....	65
B) Identificação dos perfis diferenciais de metilação do DNA na endometriose baseada na estratégia de MS-AP-PCR (Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed PCR.....	87
DISCUSSÃO .....	93
CONCLUSÕES.....	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
APÊNDICE .....	132
Etapas preliminares à identificação dos perfis diferenciais de metilação do DNA na endometriose baseada na triagem genômica de microarranjos de ilhas CpG.....	133
ANEXOS.....	138
ANEXO I.....	139
ANEXO II .....	140
ANEXO III .....	144
ANEXO IV.....	146
ANEXO V.....	148
ANEXO VI.....	150
ANEXO VII.....	152
ANEXO VIII.....	158

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Agulhas confeccionadas conforme descrito em Pires et al. (2006) e etapas do procedimento de microdissecção manual.....	42
<b>Figura 2.</b> Principais etapas da estratégia de investigação de ilhas CpG diferencialmente metiladas pela análise genômica de microarranjos de ilhas CpG.....	45
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da molécula ULS.....	49
<b>Figura 4.</b> Interpretação dos resultados da MS-AP-PCR.....	56
<b>Figura 5.</b> Os gráficos de dispersão representam os valores de fluorescência de Cy3 e Cy5 em cada uma das lâminas do experimento de <i>dye swap</i> , gerados no <i>software GeneSpring 7.3</i> .....	66
<b>Figura 6.</b> O gráfico de dispersão representa os <i>log ratio</i> de Cy5/Cy3 do experimento de <i>dye swap</i> em ambas as lâminas, gerados no <i>software GeneSpring 7.3</i> .....	66
<b>Figura 7.</b> Interface gráfica do <i>software Agilent Technologies Genomic Workbench (DNA Analytics 5.0) (Agilent Technologies)</i> ilustrando as sondas hibridadas na região do gene <i>HOXD9</i> .....	86
<b>Figura 8.</b> Análise de MS-AP-PCR a partir do DNA proveniente das amostras de endométrio eutópico e da endometriose (caso 89 e 162) digerido com as enzimas de restrição <i>HpaII</i> e <i>MspI</i> .....	88
<b>Figura 9.</b> A sequência consenso de dois fragmentos obtida pelo <i>software phredPhrap</i> foi alinhada no genoma humano pelo uso da ferramenta BLAT.....	90
<b>Figura 10.</b> A sequência consenso obtida pelo <i>software phredPhrap</i> foi alinhada no genoma humano pelo uso da ferramenta BLAT.....	90
<b>Figura 11.</b> Conteúdo de CG dos três fragmentos correspondentes aos genes <i>COL6A2</i> , <i>NXN</i> e <i>GPX3</i> , respectivamente, de acordo com ferramenta <i>CpG Plot</i> (disponível em <a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html">http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html</a> ).....	91
<b>Figura 12.</b> Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina antes e após a microdissecção manual referentes ao caso 190 (A) e ao caso 207 (B).....	134
<b>Figura 13.</b> Gráfico de dispersão ilustrando os dois componentes principais de um PCA.....	137

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alterações epigenéticas na endometriose.....	26
Tabela 2. Condições de amplificação pela PCR dos fragmentos genômicos.....	47
Tabela 3. Valores de correlação entre as réplicas ( $R^2$ ).....	69
Tabela 4. Quantidade de genes obtidos em cada caso referente fração metilada ( <i>log ratio</i> 2,0 e $p < 0,001$ ).....	70
Tabela 5. Quantidade de genes obtidos em cada caso referente fração não metilada ( <i>log ratio</i> 2,0 e $p < 0,001$ ).....	70
Tabela 6. Genes e regiões cromossômicas significantes (e suas funções) em mais de um caso da fração metilada ( <i>log ratio</i> 2,0 e $p < 0,001$ ).....	72
Tabela 7. Quantidade de genes obtidos em cada caso referente fração metilada ( <i>log ratio</i> 2,0 e $p < 0,005$ ).....	76
Tabela 8. Genes e regiões cromossômicas (e suas funções) significantes em mais de um caso da fração metilada ( <i>log ratio</i> 2,0 e $p < 0,005$ ).....	78
Tabela 9. Genes significantes constituindo famílias gênicas em cada caso da fração metilada ( <i>log ratio</i> 2,0 e $p < 0,005$ ).....	79
Tabela 10. Sondas (por gene) na fração metilada mostrando concordância com dados da literatura.....	81
Tabela 11. Sondas (por gene) na fração não metilada mostrando concordância com dados da literatura.....	82
Tabela 12. Dados clínicos das pacientes selecionadas para a triagem genômica na plataforma <i>Human CpG Island ChIP-on-Chip Set 244K (Agilent Technologies)</i> .....	146
Tabela 13. Dados clínicos das pacientes selecionadas para a análise de MS-AP-PCR....	147
Tabela 14. Quantificação dos fragmentos de DNA após a marcação com cianinas e valores da eficiência de incorporação.....	148
Tabela 15. Parâmetros obtidos após a hibridação usando a marcação do tipo <i>ULS Labeling System (Agilent Technologies)</i> e valores de referência utilizados na avaliação da qualidade das hibridações.....	150
Tabela 16. Sondas mostrando intensidades de fluorescência significantes, após as normalizações dos sinais, em pelo menos dois casos da fração metilada agrupadas por cromossomo ( $p < 0,001$ ).....	152
Tabela 17. Sondas adicionais mostrando intensidades de fluorescência significantes, após as normalizações dos sinais, em pelo menos dois casos da fração metilada agrupadas por cromossomo ( $p < 0,005$ ).....	158

# Resumo

A endometriose constitui uma doença de etiologia incerta, caracterizada pela presença de tecido endometriótico fora da cavidade uterina. É uma causa comum de morbidade, atingindo 5 a 10% das mulheres em idade reprodutiva. A metilação anormal na região promotora de genes específicos e os níveis de expressão alterados das DNA metiltransferases (DNMTs) compõem o conjunto de evidências recentes indicando a endometriose como uma doença epigenética. O presente estudo propôs a investigação do perfil diferencial de metilação do DNA na endometriose, utilizando uma abordagem genômica de alta resolução baseada na metodologia de *microarrays*. Para isso, foram coletadas amostras pareadas de endométrio eutópico e de endometriose intestinal profunda de 18 pacientes. Foram selecionadas dez amostras pareadas para a hibridação do DNA: cinco casos foram submetidos ao enriquecimento das sequências não metiladas (digerido com a enzima de restrição dependente de metilação *McrBC*) e nove ao enriquecimento das sequências metiladas (digerido com o coquetel de enzimas sensíveis à metilação do DNA *AclI*, *HinP1I*, *HpyCH4IVe HpaII*). Os ensaios foram realizados em duplicatas totalizando 28 hibridações independentes na plataforma disponível comercialmente *Human CpG Island ChIP-on-Chip Set 244K (Agilent Technologies)*. Este protocolo foi previamente padronizada utilizando-se o DNA das linhagens derivadas de carcinomas de cólon HCT116 e DKO (células HCT116 duplo *knockout* para as DNMT1 e DNMT3b) usando marcação reversa (*dye swap*). Os dados foram avaliados no *softwares Agilent Technologies Genomic Workbench (DNA Analytics 5.0)* e *GeneSpring 7.3 (Agilent Technologies)*. Entre os 925 genes que apresentaram metilação diferencial, 55 foram recorrentes em dois ou mais casos. Vários destes genes mostram-se interessantes por exercerem funções relacionadas a fatores de transcrição (*MSX1*, *EMX2*, *HOXB13*, *HOXD8* e *HOXD9*), remodeladores da cromatina (*MAD1L1*, *WDR5* e *BCOR*) ou por atuarem na regulação do ciclo celular e/ou apoptose (*BMP4*). Em paralelo, duas amostras pareadas adicionais de endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose intestinal profunda foram avaliadas pela metodologia de MS-AP-PCR (*Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*). Nesta abordagem, o DNA foi digerido com a enzima de restrição *HpaII* e sua isosquizômera *MspI*, seguido de amplificação pela PCR usando-se um oligonucleotídeo randômico. A detecção de fragmentos diferencialmente metilados ocorreu pela comparação direta do conjunto de fragmentos amplificados a partir do endométrio eutópico com o conjunto de

fragmentos amplificados a partir do tecido endometriótico pareado após a separação por eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção não isotópica. Um total de três fragmentos diferencialmente metilados na endometriose foram identificados (dois deles mostrando ganho de metilação), recuperados, clonados e sequenciados. Estes fragmentos corresponderam aos genes *COL6A2* (*collagen, type VI, alpha2*) mapeado em 21q22.3, *GPX3* (*glutathione peroxidase 3*) em 5q23 e *NXN* (*nucleoredoxin*) em 17p13.3. Nos dois últimos, os fragmentos mapearam em regiões intrônicas. O fragmento do gene *COL6A2* (provavelmente hipermetilado na endometriose) mostrou identidade com a região promotora desse gene, contendo um elevado conteúdo de CG e muito próximo a uma ilha CpG. Nossos dados sugerem que a hipermetilação da região promotora do gene *COL6A2* pode constituir um mecanismo de inativação deste gene na endometriose. Finalmente, estes achados indicam que alterações na metilação do DNA são adquiridas durante o desenvolvimento da endometriose e podem levar à identificação de novos biomarcadores para a doença.

Palavras-chave: endometriose, *microarray*, MS-AP-PCR, ilha CpG, metilação

# Abstract



Endometriosis is a disease of unknown etiology characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity. It is a common cause of morbidity, affecting 5-10% of women in reproductive ages. The aberrant methylation in the promoter region of specific genes and the higher expression levels of DNA methyltransferases (DNMTs) in comparison with normal endometrium have been reported as evidences indicating that endometriosis is an epigenetic disease. The present study investigated the differential profile of DNA methylation in endometriosis using a high-resolution microarray-based assay. There were collected paired samples of eutopic endometrium and deep intestinal endometriosis from 18 patients and, subsequently, it was selected ten pairs to the DNA hybridization: five matched samples were submitted to the enrichment of unmethylated sequences (digested with the methylation-dependent restriction enzyme *McrBC*) and ten to the enrichment of methylated sequences (digested with the cocktail of enzymes sensitive to DNA methylation *ACII*, *HinP1I*, *HpyCH4IV* and *HpaII*). The assays were performed in duplicates totalizing 28 independent hybridizations in the commercially available platform Human CpG Island ChIP-on-Chip Set 244K (Agilent Technologies). The protocol was previously standardized using the DNA from the colon carcinomas cell lines HCT116 and DKO (HCT116 cells double-knockout for DNMT1 and DNMT3b) using reverse labeling (dye swap). The data were evaluated using the softwares Genomic Workbench (DNA Analytics 5.0) and GeneSpring 7.3. Among the 925 genes showing differential methylation, 55 genes were detected in at least two cases. Several of these gene could be considered good candidates to molecular biomarkers of endometriosis since that they act as transcription factors (*MSX1*, *EMX2*, *HOXB13*, *HOXD8* e *HOXD9*), chromatin remodeling (*MAD1L1*, *WDR5* e *BCOR*) or by functions related to regulation of cell cycle and apoptosis (*BMP4*). Furthermore, two additional paired samples of eutopic and ectopic endometrium of women with intestinal endometriosis were analyzed by the methodology of MS-AP-PCR (Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction). In this approach, DNA was digested with the restriction enzyme *HpaII* and its isoschizomers *MspI*, followed by PCR amplification using a random primer. The detection of differentially methylated fragments was done by direct comparison between the amplified fragments from the eutopic endometrium and amplified fragments from the paired endometrial tissue, after separation by electrophoresis on polyacrylamide gel and non isotopic detection. A total of three differentially methylated fragments was identified (two of them

showing gains of methylation), recovered, cloned and sequenced. These fragments were aligned against the human genome and identified the *COL6A2* gene (collagen, type VI, alpha2) mapped to 21q22.3, the *GPX3* gene (glutathione peroxidase 3) at 5q23 and the *NXN* gene (nucleoredoxin) at 17p13.3. The fragments corresponding to *GPX3* and *NXN* genes were mapped into intronic regions, while the fragment of the *COL6A2* gene (probably methylated in endometriosis) revealed identity with the promoter region of this gene, this segment presented a high content of CG and was located next to a CpG island. These results suggest that hypermethylation of the promoter region of the *COL6A2* may constitute a mechanism of inactivation of this gene in endometriosis. Overall, our findings suggest that changes in DNA methylation are acquired during the development of endometriosis and that these epigenetic alterations could lead to the identification of new biomarkers for this disease.

Keywords: endometriosis, microarray, MS-AP-PCR, CpG island, methylation

# Introdução

## Epigenética

Nas células eucarióticas, o DNA encontra-se organizado em uma estrutura primária denominada nucleossomo onde a dupla fita se enrola em torno de um núcleo protéico formado por um octâmero de histonas (*core*). O nucleossomo é a unidade básica da cromatina que, em sua configuração nativa, é inacessível aos complexos de iniciação da transcrição. No entanto, algumas modificações químicas nas unidades das histonas que compõem a partícula *core*, e na própria molécula do DNA, são sinais para a ligação de complexos remodeladores da cromatina, que a modificam em conformações repressivas ou permissivas para a transcrição (Hsieh, 1994; Fukuda et al., 2006). No conjunto, estas modificações são denominadas de epigenéticas. As modificações epigenéticas constituem um mecanismo especial de regulação da expressão gênica que se sobrepõe àquela associada à sequência do DNA. Estas modificações incluem a metilação do DNA e as modificações das histonas. São consideradas reversíveis, por não alterarem a sequência do DNA, e herdáveis, por serem transmitidas de forma estável após sucessivos ciclos de divisão celular (Ushijima, 2005; Fackler et al, 2004; Rando, 2006).

A metilação do DNA é a modificação epigenética melhor caracterizada até o momento exercendo grande importância no silenciamento e regulação gênica, em particular no *imprinting* genômico, na inativação do cromossomo X e no silenciamento de transposons. Em eucariotos, ela é encontrada predominantemente no carbono da posição 5 da citosina seguida por uma guanina no dinucleotídeo CpG. Esta modificação é biologicamente relevante quando ocorre simetricamente em regiões ricas em dinucleotídeos CpG conhecidas como ilhas CpG (Herman et al., 1996). Em mamíferos, também é observada metilação em citosinas não-CpG, mas

esta é exclusivamente encontrada em células-tronco embrionárias (Lister et al., 2009).

Em média, 60% dos genes humanos apresentam uma ilha CpG na sua região promotora, sendo que algumas estendem-se até o primeiro éxon. Atualmente, uma ilha CpG é definida como um fragmento de DNA maior do que 500pb, com um conteúdo de CG maior do que 55% e onde a razão entre o número de sítios CpG observado/esperado é superior a 0,65 (Takai e Jones, 2002). Estima-se que o número total de ilhas CpG no genoma humano seja de 37 729, sendo que 35% destas são mapeadas em regiões promotoras (Han e Zhao, 2009).

No geral, a metilação do DNA nas ilhas CpG presentes nas regiões promotoras resulta em silenciamento gênico devido à inibição estérica da ligação dos complexos de transcrição à suas regiões regulatórias (Bernstein et al., 2007) ou pelo recrutamento de proteínas que se ligam à sequências CpG metiladas iniciando modificações epigenéticas coordenadas na cromatina (Esteller, 2007). Em genes transcricionalmente ativos, estas ilhas são normalmente não metiladas. Entretanto, elementos repetitivos (DNA satélite, LINES, SINES e transposons) e a região promotora de alguns genes caracterizados por ausência de expressão são geralmente metiladas na maioria dos tecidos (Espada e Esteller, 2010). É importante destacar que a metilação do DNA resultando em repressão transcricional foi também recentemente observada em regiões conhecidas como *shores* de ilhas CpG localizadas a até 2Kb de uma ilha CpG típica e que apresentam uma densidade de CpG bem menor (Irizarry et al., 2009).

Como a metilação do DNA é uma marca epigenética herdável, a manutenção e a transmissão precisa desses padrões às células filhas é um processo essencial do ciclo celular. As enzimas responsáveis pela metilação do DNA

nos dinucleotídeos CpG são membros de uma família de proteínas DNA metiltransferases (DNMTs) que utilizam a S-adenosil metionina (SAM) como doadora de grupos metil. Cinco membros de DNMTs foram identificados em mamíferos: DNMT1, DNMT2, DNMT 3A, DNMT3B e DNMT3L. A DNMT1, a mais abundante em células somáticas, possui uma forte preferência por DNA hemimetilado e está associada com a forquilha de replicação formada na fase S do ciclo celular. Assim, é a enzima responsável por copiar e manter os padrões de metilação do DNA durante a replicação. DNMT3A e 3B são expressas principalmente em células embrionárias e não diferenciadas. São críticas durante o desenvolvimento embrionário quando ocorrem ondas sequenciais de metilação *de novo* no genoma. As duas são assim, conhecidas como DNMTs *de novo*. Entretanto, alguns relatos indicam que DNMT1 assim como DNMT3A e 3B podem ter ambas as funções de manutenção e *de novo in vivo*, cooperando para a geração de um padrão global de metilação. DNMT2 e 3L não contêm domínios regulatórios compartilhados pelas outras enzimas, assim possuem atividade de metiltransferase muito baixa (Espada e Esteller, 2010).

Nas histonas, as modificações que ocorrem após a tradução representam outro grupo de modificações epigenéticas que mostram um maior nível de complexidade e diversidade (envolvem acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação de aminoácidos específicos, entre outras modificações). As interações entre a metilação do DNA e as modificações das histonas determinam um efeito importante na expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário e na diferenciação celular (Esteller, 2007).

Padrões alterados de metilação do DNA e acetilação de histonas são comuns em muitas doenças humanas, incluindo câncer, e há evidências de que a perda da regulação epigenética pode ser o evento transformante preliminar

(Feinberg, 2005). Como exemplo, podemos citar a hipometilação global do DNA e a hipermetilação promotor-específica [e mais atualmente, a hipermetilação de miRNAs (Lujambio et al., 2007; Lujambio e Esteller, 2007)] que são normalmente observadas em neoplasias benignas e em tumores em estágio inicial. Isto sugere que essas alterações epigenéticas são eventos precoces na perda da homeostasia celular e podem, inclusive, preceder mutações genéticas e instabilidade genômica (Esteller, 2007). Portanto, a identificação dos perfis anormais de metilação não só em ilhas CpG, mas também em regiões adjacentes, está se tornando uma ferramenta importante para a compreensão tanto da expressão gênica normal como em diferentes doenças.

O conhecimento dos eventos moleculares que iniciam e mantêm o silenciamento epigenético pode levar ao desenvolvimento de novas abordagens relacionadas à identificação de marcadores diagnósticos e prognósticos para as doenças humanas, bem como de terapias alternativas capazes de reverter esses eventos que conduzem à proliferação celular anormal (Polo e Almouzni, 2005; Baylin e Ohm, 2006).

## **Endometriose**

A endometriose constitui uma doença de etiologia incerta, que afeta 5 a 10% das mulheres em idade reprodutiva e está associada à considerável morbidade. Caracteriza-se pela presença de tecido endometriótico (glândula e estroma) fora da cavidade uterina, sendo encontrada primariamente na cavidade e órgãos abdominais e pélvicos, como peritônio, ovários, tubas uterinas, superfície externa do útero e membranas e ligamentos do útero e pelve. Menos comumente, as lesões endometrióticas podem invadir a parede do reto, bexiga, intestino ou apêndice.

Raramente, a endometriose se desenvolve em sítios externos ao trato reprodutivo, tais como pulmões, cérebro e tecidos periféricos como o nervo ciático (Giudice & Kao, 2004).

Esses implantes de tecido endometrial permanecem responsivos hormonalmente (Kitawaki et al., 2002), estimulam a angiogênese (Girling & Rogers, 2005), podem ser altamente invasivos e, ainda, podem resultar em adesões e distorções da cavidade pélvica, características essas que podem explicar as principais queixas clínicas apresentadas pelas pacientes com endometriose: dor pélvica crônica, dismenorréia (dor pélvica durante menstruação), dispareunia (dor durante relação sexual) e infertilidade (Wu et al., 2007a); este último ocorrendo em 30% a 50% das mulheres com endometriose. Além destes, há sintomas decorrentes da localização do sítio da lesão como alterações intestinais e urinárias, principalmente durante o período menstrual.

Em mulheres assintomáticas, a prevalência de endometriose é de 2% a 22%. Essa incidência aumenta para 25% a 50% em mulheres com infertilidade e para 40% a 60% em mulheres que apresentam dismenorréia. Além disso, a severidade dos sintomas e a probabilidade do diagnóstico aumentam com a idade, sendo que o pico de incidência se dá ao redor de 40 anos de idade (Farquhar, 2007). Entre os principais fatores de risco dessa doença podem-se citar a menarca precoce e menopausa tardia, ciclos menstruais curtos e intensos e nuliparidade (Campbell & Thomas, 2001).

A hipótese diagnóstica de endometriose inicialmente é elaborada baseando-se na história clínica da paciente. Ultrassonografia transvaginal e ressonância magnética podem também auxiliar, entretanto, os métodos não-cirúrgicos permanecem não confiáveis na identificação e avaliação da extensão da



lesão endometriótica. Embora as concentrações de CA125 possam estar levemente aumentadas em mulheres com endometriose, a dosagem desse antígeno não é considerada útil no estabelecimento do diagnóstico (Farquhar, 2007). Assim, na maioria dos casos, esta doença é diagnosticada após a cirurgia e estadiada com base na localização, extensão e tipo de lesão por laparoscopia. Além disso, o diagnóstico final é dado pela análise histopatológica da lesão. Mesmo assim, algumas lesões endometrióticas podem passar despercebidas na cirurgia, podendo a doença ser confundida com algumas condições menores (Barlow & Kennedy, 2005).

A endometriose é classificada em quatro estadiamentos, de acordo com a *American Society for Reproductive Medicine* (1997): forma mínima (estadio I), leve (II), moderada (III) e severa (IV). Este método mundialmente aceito é baseado em um sistema de pontos aplicados após a avaliação de critérios como: diâmetro, localização, aparência e quantidade de lesões, presença de processos aderenciais, tempo de recorrência, taxa de efeitos adversos ao tratamento, predição sobre a probabilidade de gravidez, facilidade da intervenção cirúrgica (ranqueada como fácil, moderada, difícil ou muito difícil), entre outros.

O tratamento atual inclui terapia medicamentosa e/ou cirúrgica, sendo a última o procedimento de escolha. Entretanto, o risco de recorrência após a cirurgia é elevado: 7-30% após três anos. Este risco aumenta para 40-50% cinco anos após a cirurgia. Assim, terapia médica adjuvante pós-cirúrgica torna-se também necessária (Guo, 2009a).

Como a endometriose é uma doença dependente de estrógeno, o tratamento atual tem como objetivo a alteração hormonal do ciclo menstrual para produzir uma pseudo-gravidez, pseudo-menopausa ou anovulação crônica, criando

um ambiente hipoestrogênico, acíclico e, conseqüentemente, a atrofia dos implantes endometrióticos. A terapia padrão inclui analgésicos (antiinflamatórios não esteroidais), contraceptivos orais, agentes androgênicos, progestágenos e antiestrogênicos e agonistas do GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone*). Entretanto, tal tratamento é limitado por ter uma duração curta devido aos efeitos colaterais hipoestrogênicos substanciais como fogachos, vagina ressecada e perda da densidade mineral óssea. Além disso, a recorrência de dor pélvica ocorre em 30-70% das pacientes entre 6 a 18 meses depois da descontinuação do tratamento (Hassan et al., 2009).

Quanto à origem histológica ainda não há um consenso na literatura. A teoria mais aceita é a da implantação metastática ou de Sampson (1927), que propõe que fragmentos de endométrio menstrual passariam, por um fluxo menstrual retrógrado, através das tubas uterinas e se implantariam na cavidade abdominal. Em contraste, a hipótese da metaplasia celômica (descrita em 1919 por Meyer) propõe que as lesões endometrióticas dentro da cavidade peritoneal se originariam pela diferenciação de células mesoteliais em tecido semelhante ao endométrio. Uma terceira hipótese argumenta que o tecido menstrual da cavidade endometrial poderia se dirigir a outros sítios pelos vasos sanguíneos e linfáticos. Finalmente, uma última hipótese propõe que células-tronco circulantes, originadas na medula óssea e que contribuiriam para a repopulação das células endometriais no útero, seriam as responsáveis pelo desenvolvimento de implantes endometrióticos ectópicos. Acredita-se que essas células teriam a capacidade de se diferenciar em múltiplos tecidos, incluindo células endoteliais, hepatócitos, neurônios, pele, cardiomiócitos e epitélio gastrointestinal (Sasson & Taylor, 2008; Bulun, 2009).

Em resumo, acredita-se que a endometriose pode ser decorrente de diversas alterações anatômicas ou bioquímicas da função uterina ou ainda, da perda do controle dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos principalmente, na proliferação endometrial. Estes últimos foram responsáveis pela mudança da classificação da endometriose de apenas uma alteração local para uma doença crônica sistêmica e complexa (Bulun, 2009), resultante das interações entre fatores genéticos e ambientais.

### **Epigenética da Endometriose**

Quanto aos mecanismos moleculares, sabe-se que existem diferenças específicas entre o tecido endometriótico e o endométrio eutópico, tais como os elevados níveis de estrógeno, prostaglandinas e citocinas no tecido endometriótico. Estudos recentes (Eyster et al., 2002; Arimoto et al., 2003; Kao et al., 2003; Absenger et al., 2004; Matsuzaki et al., 2004, 2005; Hu et al., 2006; Wu et al., 2006a; Burney et al., 2007; Chand et al., 2007; Flores et al., 2007; Hever et al., 2007; Borghese et al., 2008; Hull et al., 2008; Sherwin et al., 2008; Zafrakas et al., 2008; Laudanski et al., 2009) empregando abordagens de análise genômica em larga escala mostraram perfis diferenciais de expressão gênica entre endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose. Ultimamente, alterações epigenéticas têm sido observadas mediando os padrões de expressão diferenciais de genes alvo na etiopatogenia da endometriose (Wu et al., 2005, 2006b; Xue et al., 2007a, 2007b) ou secundárias à expressão anormal das DNA metiltransferases (Wu et al., 2007c).

Alguns estudos recentes indicaram que alterações dos padrões de metilação do DNA ocorrem na endometriose (para revisão, Guo, 2009b). Na tabela 1

encontra-se a lista das publicações que formam o conjunto de evidências que apóia a hipótese de que a endometriose é uma doença epigenética.

**Tabela 1.** Alterações epigenéticas na endometriose.

REFERÊNCIA	GENE*	PRINCIPAIS ACHADOS	GRUPO AMOSTRAL
Martini et al., 2002	<i>CDKN2A</i> <i>MLH1</i>	Quatro amostras mostraram hipermetilação para o gene <i>MLH1</i> e uma amostra para o gene <i>CDKN2A</i>	Quarenta e seis casos de endometriose
Wu et al., 2005	<i>HOXA10</i>	A hipermetilação foi associada a baixos níveis de expressão gênica	Seis amostras de endometriose, quatro biópsias endometriais de mulheres sem endometriose e cinco amostras de sangue menstrual de mulheres sem endometriose
Wu et al., 2006b	<i>PGR</i>	Este gene encontra-se hipermetilado na endometriose	Oito amostras de endometriose, seis amostras de endométrio eutópico de pacientes com endometriose e quatro controles (endométrio de pacientes sem endometriose)
Kim et al., 2007	<i>HOXA10</i>	A metilação deste gene na endometriose foi detectada em babuínos	Endometriose foi induzida experimentalmente em seis fêmeas pela inoculação de endométrio menstrual
Xue et al., 2007a	<i>ESR2</i>	A perda da metilação da região promotora deste gene foi detectada na endometriose	Oito amostras de endométrio eutópico e oito amostras de endometriose não pareadas
Xue et al., 2007b	<i>NR5A1(SF1)</i>	A hipermetilação foi associada com a ausência de expressão deste fator no estroma de endométrio, mas não na endometriose	Oito amostras de endométrio de mulheres sem endometriose e oito amostras de endometriose

Tabela 1. (continuação)

REFERÊNCIA	GENE*	PRINCIPAIS ACHADOS	GRUPO AMOSTRAL
Wu et al., 2007b	<i>CDH1</i>	Hipermetilação associada ao silenciamento gênico	Linhagens celulares
Izawa et al., 2008	<i>CYP19A1</i> ( <i>aromatase</i> )	Os níveis de expressão da aromatase foram significativamente maiores após o tratamento das células endometrióticas com o agente desmetilante 5-aza-2'-desoxicitidina	O tecido endometrial foi obtido de 12 pacientes sem endometriose e amostras de endometriose ovarianas foram obtidas de 18 pacientes
Lee et al., 2009	<i>HOXA10</i>	A hipermetilação foi confirmada nas amostras de endometriose	Amostras de endometrioses induzidas experimentalmente em camundongos (grupo de oito animais)

\*Símbolo oficial do gene conforme recomendações do *Guidelines for Human Gene Nomenclature* (<http://www.genenames.org/guidelines.html>): *CDKN2A*, *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)* também conhecido por *p16*, *MLH1*, *mutL homolog 1*, *colon cancer, nonpolyposis type 2*, *HOXA10*, *homeobox A10*, *PGR*, *progesterone receptor*, *CYP19A1*, *cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1* ou *aromatase*; *ERS2*, *estrogen receptor 2* ou *ER beta*, *NR5A1* - *nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1* também conhecido como *SF-1*, *steroidogenic factor 1*, *CDH1*, *cadherin 1, type 1*, *E-cadherin (epithelial)*.

Martini et al. (2002) descreveram a hipermetilação do gene *MLH1* (*mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2*) em quatro dos 46 casos de endometriose após análise de MSP (*Methylation Specific Polymerase Chain Reaction*). Destes, dois eram classificados como grau IV e dois mostravam a coexistência de endometriose e carcinoma de endométrio. Desses 46 casos, apenas um, classificado como endometriose atípica, mostrou a metilação anormal do gene *CDKN2A* [*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)*]. Os autores sugeriram que a expressão reduzida do gene *MLH1* pode estar envolvida na evolução da endometriose para fenótipos agressivos.

Wu et al. (2005) demonstraram que a hipermetilação da região promotora do gene *HOXA10* (*homeobox A10*) poderia explicar os níveis diminuídos de expressão deste gene na endometriose. O gene *HOXA10* é um membro de uma família de fatores de transcrição expressos no endométrio (Kim et al., 2007) e é regulado pela ação do estrógeno e da progesterona (Taylor et al., 1998; Gui et al., 1999). A hipermetilação foi observada em seis amostras de tecido endometriótico por MSP e subsequente confirmação pelo sequenciamento do DNA modificado pelo bissulfito de sódio.

Posteriormente, Wu et al. (2006b) descreveram a presença de hipermetilação na região promotora do gene *PGR* (*progesterone receptor*) em seis de oito amostras de endométrio ectópico empregando uma combinação de microdissecção a *laser* (LCM), MSP e sequenciamento após modificação pelo bissulfito de sódio. Os autores sugeriram que essa metilação anormal poderia ser responsável pelos baixos níveis de expressão de receptores de progesterona, o que explicaria o fato de 9% das mulheres com endometriose não responderem ao tratamento com progestina.

Xue et al. (2007a) demonstraram que a metilação da ilha CpG na região promotora do gene *ESR2* (*estrogen receptor 2, ER beta*) representa o mecanismo primário da expressão diferencial deste gene no endométrio e na endometriose. Ao contrário dos estudos anteriores, a presença de metilação na região promotora do gene *ESR2*, observada nas oito amostras de endométrio eutópico analisadas, foi associada aos baixos níveis de expressão deste receptor no endométrio eutópico e a perda de metilação foi correlacionada com os níveis elevados de expressão na endometriose. A hipermetilação na ilha CpG presente na região promotora deste gene foi detectada pelo sequenciamento do DNA modificado pelo bissulfito de sódio

e confirmada após a verificação do aumento na expressão do receptor após o tratamento das células endometriais normais com o agente desmetilante 5-aza-2'-desoxicidina.

Um achado semelhante foi descrito para o gene *NR5A1* (também denominado de *SF1* ou *steroidogenic factor 1*) que codifica um fator de transcrição essencial para a ativação de vários genes das vias de biossíntese de estrógenos. Xue et al (2007b) relataram que a hipometilação da ilha CpG deste gene está correlacionada com a sua ativação transcricional na endometriose. A metilação nas células normais foi também observada após sequenciamento do DNA pelo bissulfito de sódio em oito amostras de endométrio eutópico de mulheres sem endometriose. Tratamento com 5-aza-2'-desoxicidina, análises de metilação *in vitro* e imunoprecipitação da cromatina foram também realizados e confirmaram os resultados obtidos.

No entanto, a principal evidência para o envolvimento das alterações epigenéticas na endometriose foi dada pelos padrões de expressão anormais das DNA metiltransferases. Wu et al. (2007c) estudaram o padrão de expressão das metiltransferases após a microdissecção a laser dos tecidos em 13 amostras de endométrio ectópico, 10 amostras de tecido endometrial eutópico de mulheres com endometriose e oito endométrios de mulheres sem endometriose. Foi observado um aumento na expressão das DNMT1, DNMT3A e DNMT3B na endometriose em relação aos demais tecidos. No conjunto, estes achados fortemente sugerem o envolvimento de padrões anormais de metilação do DNA na patogênese desta condição.

## Estratégias para a Identificação do Metiloma Humano

O metiloma compreende o conjunto completo de citosinas metiladas do genoma e inclui sítios individuais de metilação do DNA, variação regional subcromossômica e níveis globais de metilação. Como tal, é análogo ao transcriptoma (o padrão de expressão gênica de uma célula), com o qual se sobrepõe (Feinberg, 2001). Apesar da introdução do termo “metiloma” ter ocorrido há nove anos na literatura, a caracterização da metilação do DNA tem progredido lentamente de uma perspectiva genômica, mas em contrapartida, é relativamente bem compreendida de uma perspectiva gênica (Callinan e Feinberg, 2006).

Inicialmente, é necessário o entendimento de alguns conceitos antes da escolha da abordagem metodológica a ser empregada para o estudo da metilação do DNA.

O *conteúdo* de metilação constitui uma determinação quantitativa dos níveis globais de metilação do DNA numa amostra, ou seja, a porcentagem de citosinas metiladas que está presente. O *nível* de metilação é determinado pela avaliação quantitativa de um único dinucleotídeo CpG do genoma em todas as moléculas de DNA presentes numa amostra enquanto o *perfil* de metilação pode ser alcançado pela análise semi-quantitativa, quantitativa ou qualitativa de múltiplos e independentes dinucleotídeos CpG em um *pool* de DNA. Por último, para a detecção do *padrão* de metilação são avaliados múltiplos dinucleotídeos CpG ligados ou uma combinação particular de CpG em moléculas individuais (Siegmund e Laird, 2002).

As metodologias em larga escala geralmente buscam a caracterização dos perfis de metilação do DNA, mas uma limitação substancial ao entendimento do metiloma está relacionada aos principais métodos de detecção atualmente utilizados



em relação a alguns parâmetros como sensibilidade, especificidade e custo. Tais métodos podem ser divididos em três categorias:

1. Sequenciamento do DNA modificado por bissulfito de sódio: envolve a conversão química da citosina para uracila pelo bissulfito de sódio, seguido de PCR (que incorpora T no lugar de U) e então, o sequenciamento do DNA. Apesar de a resolução ser de uma única base, o custo é o mais elevado de todos os métodos comumente empregados, dezenas de centenas de dólares para cada 1Mb de dados de sequência. Assim, não é atualmente adequado para análises em larga escala de amostras múltiplas.
2. Métodos que interrogam dinucleotídeos CpG únicos específicos ou amplicons: nesta categoria são incluídos MS-AP-PCR (*Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*) (Liang et al., 1998; 2002), *MethyLight* (Eads et al., 2000), COBRA (*COmbined Bisulfite Restriction Analysis*) (Xiong e Laird, 1997), pirosequenciamento por bissulfito de sódio (Dupont et al., 2004) e ensaios de metilação *GoldenGate Illumina* (Bibikova et al., 2006). Embora sensíveis, específicos e com custo relativamente baixo, nenhum destes métodos é adequado para análises em larga escala, que inclui aproximadamente 28 milhões de dinucleotídeos CpG.

A técnica de MS-AP-PCR (Liang et al., 1998; 2002) envolve a digestão do DNA com enzimas de restrição sensíveis à metilação e suas isosquizômeras (que reconhecem o mesmo sítio de restrição porém não são sensíveis à metilação dos mesmos) e posterior amplificação pela PCR. Geralmente, utiliza-se a endonuclease *HpaII* que reconhece e cliva o sítio de restrição CCGG, mas que não atua sobre este sítio quando a citosina interna encontra-se metilada (C<sup>m</sup>CGG), e a endonuclease *MspI* que atua como controle experimental, pois reconhece o mesmo sítio de

restrição e cliva tanto na presença quanto na ausência da metilação. A metilação diferencial é observada pela amplificação de uma banda específica no DNA digerido com *HpaII* e ausência de amplificação no DNA digerido com *MspI* (Szabó et al., 2000). Esta metodologia é sensível e rápida para a detecção de perfis anormais de metilação pela comparação direta do conjunto de fragmentos amplificados entre diferentes tecidos após a separação por eletroforese em gel de poliacrilamida. Além disso, a MS-AP-PCR permite a detecção não só de fragmentos hipermetilados, mas também, e principalmente, de regiões hipometiladas, como DNA satélite, consideradas importantes por estarem associadas com instabilidade cromossômica observadas em cânceres humanos, como descrito por Costa et al. (2006). Contudo, geralmente o número de bandas observadas em um gel é limitado, o que indica a necessidade de se avaliar um número significativo de amostras e de diferentes conjuntos de oligonucleotídeos arbitrários. Além disso, sendo uma técnica dependente de enzimas de restrição, apenas os dinucleotídeos CG presentes no sítio da enzima empregada é que serão investigados. Apesar destas limitações, esta técnica foi efetiva na identificação de alguns marcadores epigenéticos em diferentes doenças humanas (Gonzalvo et al., 1997; Kohno et al., 1998; Chango et al., 2006; Costa et al., 2006; Suzuki et al., 2006).

3. Métodos baseados em *microarray*. estes podem interrogar um número bastante elevado de CpGs em comparação às demais abordagens, apresenta um baixo custo por unidade já que este é similar a outros métodos baseados em *array*. Nesta categoria podemos citar três tipos principais de análise:

§ Imunoprecipitação do DNA metilado (MeDIP): o DNA metilado é fracionado pelo uso de um anticorpo e então, hibridado contra um DNA controle total marcado diferencialmente em um *array* de oligonucleotídeos.

- § Digestão com enzimas de restrição sensíveis à metilação seguido de amplificação por PCR mediada por ligação de adaptadores: o primeiro ensaio foi a DMH (*Differential Methylation Hybridization*) (Huang et al., 1999) para se identificar *loci*/hipermetilados em amostras provenientes de tecidos referência (normais) ou testes (câncer, por exemplo). Primeiramente, o DNA é fragmentado por enzimas de restrição, como *MseI*. Os fragmentos de DNA resultantes são ligados a adaptadores sintéticos (*linkers*) e o *status* de metilação é interrogado por endonucleases sensíveis à metilação como *BstUI* e/ou *HpaII*. Os fragmentos metilados, protegidos da digestão, são amplificados por uma reação de PCR *linker*-dependente enquanto os fragmentos não metilados são digeridos e assim, não serão amplificados. Os amplicons gerados das amostras referência e teste são marcados com *dyes* fluorescentes, misturados em iguais proporções e co-hibridados em uma lâmina de *microarray* contendo sondas de ilhas CpG. Após a hibridação, as lâminas são lavadas e digitalizadas. As intensidades das fluorescências refletem, dessa forma, o *status* de metilação dentro de cada *locus* em uma amostra teste em relação à amostra referência. Além desta, outro método bastante empregado é o ensaio HELP (*HpaII tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR*) (Khulan et al., 2006). Neste, o DNA é digerido com *MspI* (resistente à metilação do DNA) em paralelo, e então os produtos *HpaII* e *MspI* são amplificados por PCR mediada por ligação de adaptadores e co-hibridadas em um *array* com fluorocromos diferentes.
- § Digestão do DNA metilado com a enzima de restrição *McrBC*, sem PCR, e hibridação diferencial em um *array*. o DNA é digerido com *McrBC*, uma enzima com uma propriedade incomum de digerir DNA metilado

promiscuamente (sítio de reconhecimento  $R^mC(N)_{55-103}R^mC$ , onde R representa as purinas). Consequentemente, esta enzima tem a capacidade de clivar metade do DNA metilado no genoma e todas as ilhas CpG metiladas. Posteriormente os fragmentos digeridos não metilados são selecionados por tamanho (1,5-4,0Kb) e comparativamente hibridados (duas cores) em *arrays* de alta densidade, com DNA não digerido com a enzima. Empregando-se esta enzima é possível interrogar mais de um milhão dos 1,7 milhões de dinucleotídeos CpG presentes nas ilhas CpG, culminando com uma cobertura quatro vezes maior em comparação com os demais métodos (Kamalakaran et al., 2009).

Uma limitação quanto a sensibilidade destes métodos está na utilização da enzima *HpaII* cujos sítios compreendem apenas 8% de CpGs totais do genoma, sendo a maioria destes localizados em sequências repetitivas (Fazzari e Greally, 2004). Dos cerca de 1,7 milhões de dinucleotídeos CpG localizados nas ilhas CpG, apenas cerca de 225.000 podem ser interrogados com o uso desta enzima (Kamalakaran et al., 2009). Alternativas para se contornar essas importantes limitações metodológicas seria o uso combinado de diferentes enzimas de restrição. Ao combinar duas ou três enzimas de restrição que preferencialmente tenham seus sítios de corte dentro das ilhas CpG, praticamente todos os fragmentos diferencialmente metilados poderiam ser avaliados (Li et al., 2002). Além disso, a identificação de diferenças de metilação pode ser realizada pelo uso da enzima *McrBC*.

Dessa forma, na tentativa de superar as limitações inerentes à metodologia, várias adaptações foram implantadas principalmente quanto ao emprego de diferentes combinações de enzimas de restrição como *XmaI/SmaI*

(MCAM - *Methylated CpG island Amplification Microarray*) (Toyota et al., 1999). Uma variação adicional da DMH é a Mmass (*Microarray-based Methylation Assessment of Single Samples*) (Ibrahim et al., 2006) que emprega um coquetel de enzimas sensíveis à metilação (*BstUI*, *HhaI* e *HpaII* ou *AclI*, *HinP1I*, *HpyCH4IV* e *HpaII*) para enriquecer sequências metiladas e *McrBC* para enriquecer sequências não metiladas. O DNA digerido proveniente de ambas as frações são amplificados após ligação de adaptadores, marcados com fluorocromos diferentes e co-hibridados em um *array* de ilhas CpG. Além dessas, uma abordagem recentemente elaborada que independe do método de digestão, chamada CHARM (*Comprehensive High throughput Arrays for Relative Methylation*), pode detectar metilação do DNA em larga escala com sensibilidade de quase 100% e 90% de especificidade (Irizarry et al., 2008, 2009) porque emprega uma otimização do desenho da plataforma de *array* e do processamento dos dados. Esta metodologia interroga aproximadamente 4,6 milhões de sítios CpG (mais do que qualquer outra abordagem) empregando um *microarray* customizado que inclui quase todas as ilhas CpG bem caracterizadas do genoma humano, bem como as regiões conhecidas como *shores* de ilhas CpG.

# Objetivos

A metilação do DNA é parte de um processo de regulação epigenética que altera a conformação da cromatina. Potencialmente, ela afeta vários *locus* simultaneamente, alguns dos quais podem ser cruciais para o início e/ou progressão da endometriose. Baseado nesta hipótese, foi proposto este estudo que visa:

- § Investigar se amostras pareadas de endométrio eutópico e ectópico mostram um perfil diferencial de metilação do DNA; para tanto duas abordagens metodológicas foram utilizadas:

**Abordagem A:** Identificação dos perfis diferenciais de metilação do DNA na endometriose baseada na triagem genômica de microarranjos de Ilhas CpG

**Abordagem B:** Identificação dos perfis diferenciais de metilação do DNA na endometriose baseada na estratégia de MS-AP-PCR (*Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed PCR*)

- § Pesquisar na literatura e bancos de dados genômicos as funções biológicas dos genes diferencialmente metilados que possam estar associadas à origem ou progressão da endometriose.
- § Selecionar genes para as etapas futuras de validação pela análise do padrão de metilação por MSP (*Methylation Specific Polymerase Chain Reaction*) quantitativa em tempo real em um conjunto independente de amostras.

# Material e Métodos



## A) IDENTIFICAÇÃO DOS PERFIS DIFERENCIAIS DE METILAÇÃO DO DNA NA ENDOMETRIOSE BASEADA NA TRIAGEM GENÔMICA DE MICROARRANJOS DE ILHAS CpG

### A.1 Amostras

Um total de 18 amostras pareadas de endometriose profunda intestinal e endométrio eutópico foram selecionadas junto ao Banco de Tecidos e Fluidos Corporais de Pacientes com Endometriose do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina – USP, São Paulo, após a aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos (CAPPesq) da Instituição (ANEXO I).

O material biológico foi coletado somente após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO II) e preenchimento de um questionário pelas pacientes incluídas no estudo. No questionário foram obtidas informações como idade, antecedentes pessoais, histórico familiar, hábitos, uso de medicamentos, principais sintomas, regularidade e duração do ciclo menstrual. Além destas, também foram obtidos os dados clínicos como dosagem de CA125, presença de focos múltiplos, tamanho, profundidade e demais características da lesão, histórico de cirurgias prévias e seguimento clínico.

Os tecidos de endométrio eutópico foram obtidos após raspagem da cavidade uterina enquanto as amostras de tecidos provenientes da endometriose foram obtidas por laparoscopia. O diagnóstico de endometriose foi confirmado por uma patologista após exame histopatológico.

Durante a laparoscopia, a lesão foi classificada de acordo com critérios da *American Society for Reproductive Medicine* (1997) em estádios I a IV (ANEXO III).

As lesões também foram classificadas histologicamente de acordo com Abrão et al. (2003) em:

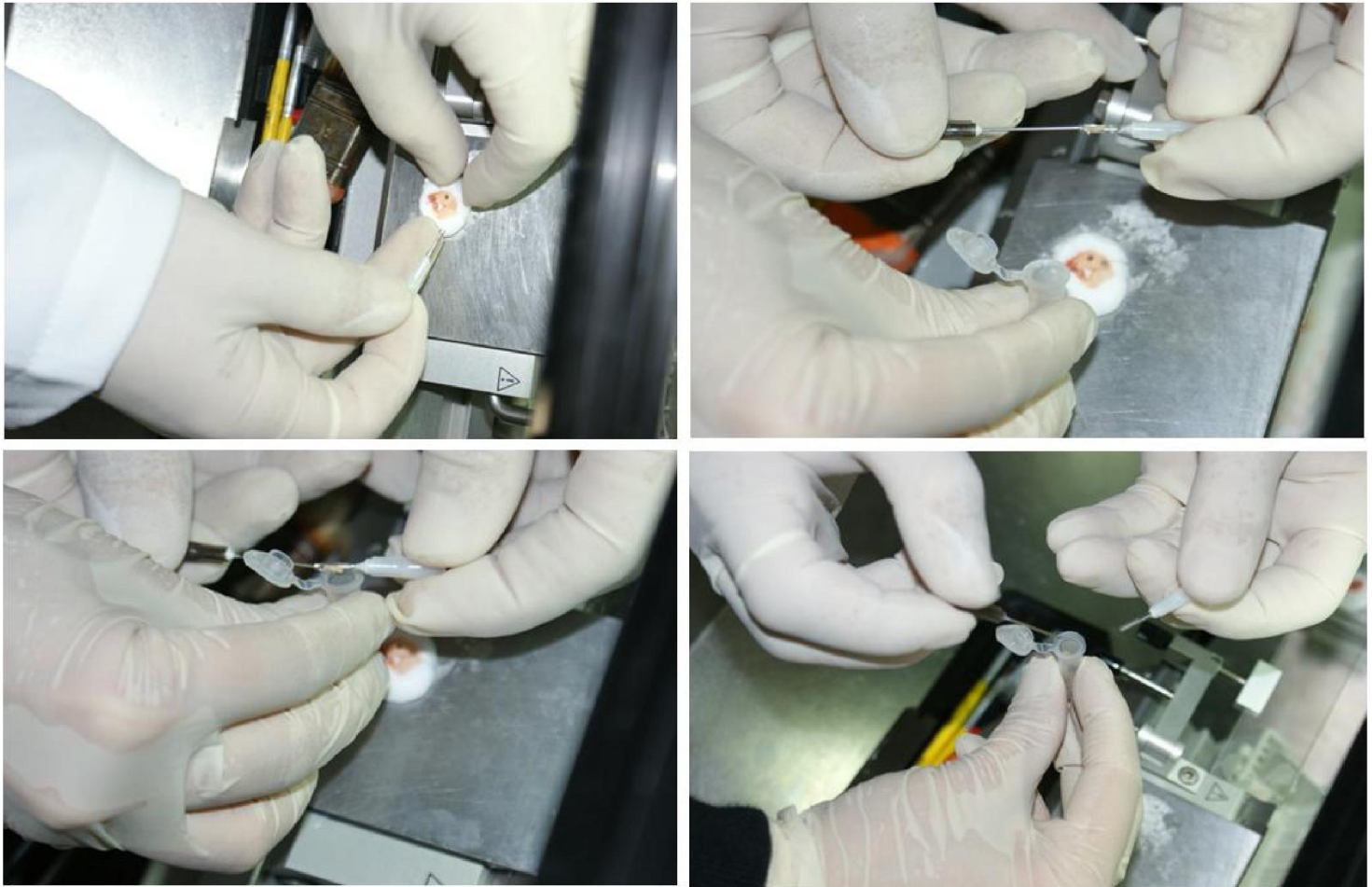
- § Padrão estromal - presença de estroma morfológicamente similar ao do endométrio eutópico em qualquer fase do ciclo;
- § Padrão glandular bem diferenciado - presença de epitélio superficial ou constituindo espaços glandulares, composto por células epiteliais com morfologia indistinguível dos endométrios eutópicos nas diferentes fases do ciclo menstrual;
- § Padrão glandular indiferenciado - presença de epitélio superficial ou constituindo espaços glandulares, sem as características morfológicas vistas no epitélio endometrial eutópico;
- § Padrão glandular misto: presença, na mesma localização, de epitélios com padrão bem diferenciado e indiferenciado.

Todos os dados foram coletados pelo Dr. Maurício Simões Abrão, coordenador do Setor de Endometriose da Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e colaborador deste projeto.

Os tecidos foram armazenados em criotubos a  $-80^{\circ}\text{C}$ , devidamente codificados.

## A.2 Microdissecção manual

As amostras de endometriose congeladas foram microdissecadas manualmente com o auxílio de um criostato (Leica) de acordo com protocolo descrito por Pires et al. (2006), com modificações. Este procedimento foi realizado junto ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, com a supervisão do médico patologista Dr. Alexandre Fabro que identificou áreas isoladas de endometriose que pudessem ser separadas com segurança e inequivocamente do tecido intestinal adjacente. Agulhas (16 e 18 *gauge*) foram confeccionadas com o auxílio de uma microretífica Dremel, 300-N/25 110V. O bisel foi retirado para se formar uma extremidade reta e uma “janela” foi aberta na lateral da agulha a aproximadamente 1-2mm da sua extremidade. As regiões contendo as lesões endometrióticas no tecido intestinal foram demarcadas após o preparo de lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Posteriormente, o bloco de tecido congelado foi microdissecado com o auxílio das agulhas previamente confeccionadas. O tecido foi, então, retirado pela lateral da agulha e introduzido em microtubos de 0,5mL para posterior extração do DNA genômico (Figura 1). Novas lâminas foram preparadas para a confirmação da microdissecção apenas das áreas contendo as lesões endometrióticas.



**Figura 1.** Agulhas confeccionadas conforme descrito em Pires et al. (2006) e etapas do procedimento de microdissecção manual.

### A.3 Obtenção do DNA genômico

A extração do DNA dos tecidos de endométrio eutópico e ectópico foi conduzida pela desagregação mecânica e enzimática adicionando-se proteinase K na concentração final de 100µg/mL, tampão de extração (100mM de Tris pH 8,0; 50mM de EDTA e 500mM de NaCl) num volume final de 500µL e 50µL de SDS 20%. Após homogeneização, o tubo foi incubado a 37°C, *overnight* ou até a dissolução completa do tecido.

Após a digestão protéica, foi realizada a extração padrão com solventes orgânicos. Foi adicionado um igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) seguido de homogeneização por um minuto e centrifugação a 14000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Este passo foi novamente realizado após o tratamento com RNase A na concentração final de 40µg/mL durante 1 hora a 37°C. O sobrenadante foi novamente transferido para um novo tubo e a este foi adicionado um igual volume de clorofórmio. Novamente foi feita a homogeneização por 1 minuto e centrifugação a 14000 rpm por 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e o volume da amostra foi estimado. O DNA foi precipitado adicionando-se aproximadamente 10% deste volume de acetato de amônio 7,5M e 2 a 3 volumes de etanol absoluto gelado. O microtubo foi mantido à -20°C *overnight* ou à -80°C durante 1 hora. Em seguida, o material foi centrifugado a 14000 rpm durante 15 minutos e depois de descartado o sobrenadante, o *pellet* foi lavado com etanol 70%, secado em temperatura ambiente e ressuscitado em 50 ou 80µL de água ultra-pura estéril, sendo posteriormente armazenado em *freezer* -20°C. A quantidade e qualidade do DNA isolado foram avaliadas através da leitura em espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* e após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%.

#### A.4 Triagem de ilhas CpG diferencialmente metiladas pela análise de microarranjos de Ilhas CpG

A identificação das ilhas CpG diferencialmente metiladas pela análise genômica de microarranjos de ilhas CpG foi baseada na metodologia de MMass (*Microarray-based Methylation Assessment of Single Samples*) (Ibrahim et al., 2006), com modificações. A Figura 2 resume as principais etapas desta estratégia e que serão descritas detalhadamente seguindo-se a sequência do protocolo.

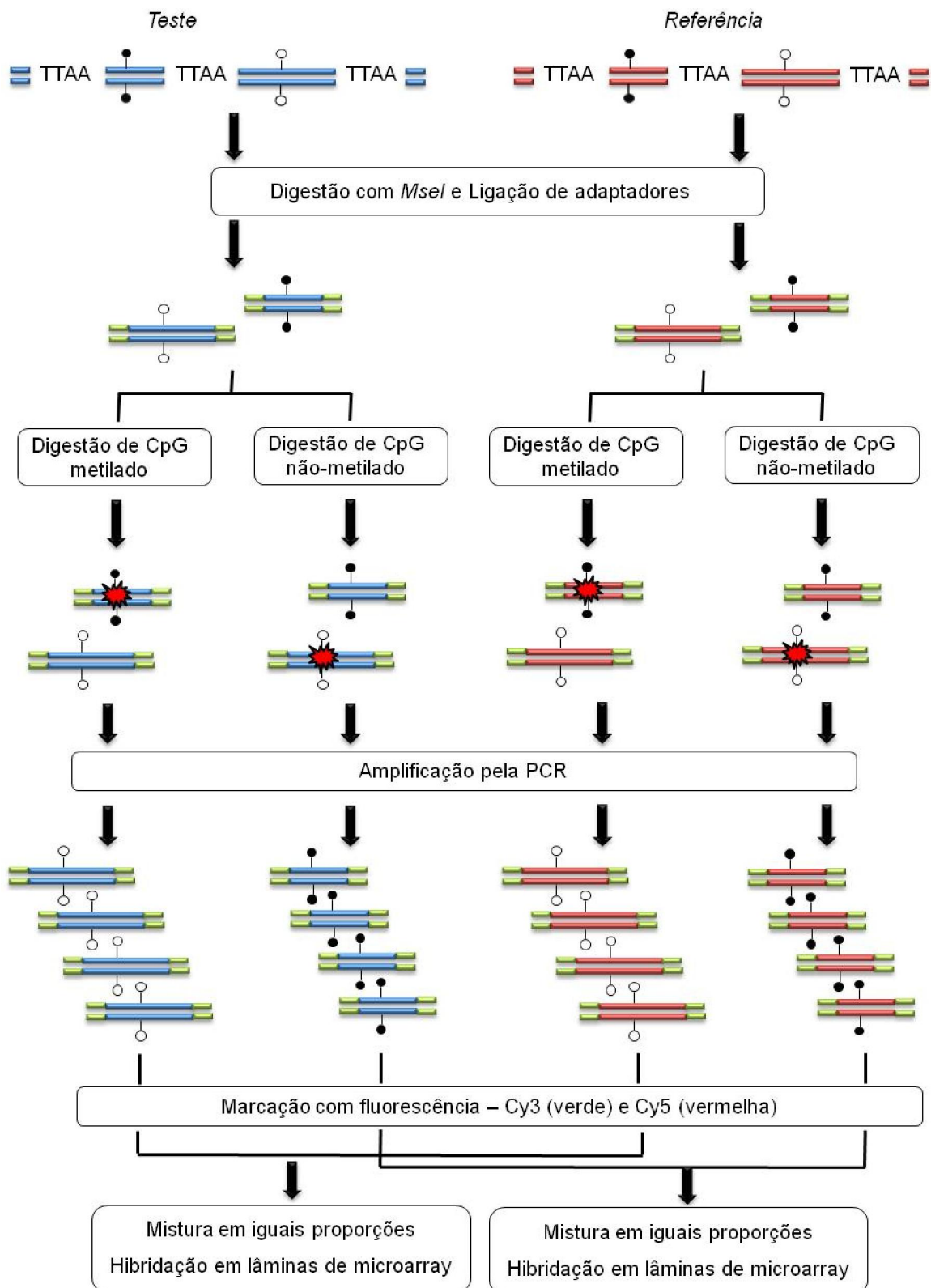


Figura 2. Principais etapas da estratégia de investigação de ilhas CpG diferencialmente metiladas pela análise genômica de microarranjos de ilhas CpG. Neste esquema, teste refere-se ao DNA genômico obtido da endometriose e referência ao DNA genômico do endométrio eutópico obtido da mesma paciente.

#### A.4.1 Digestão com *Mse*I e Ligação de Adaptadores

Entre 1 e 3µg de DNA genômico proveniente de amostras pareadas foi digerido isoladamente com 20U da enzima de restrição *Mse*I a 37°C *overnight* num volume final de 30µL seguido de 10 min a 65°C para inativação enzimática. Em seguida, o DNA digerido foi ligado aos *linkers* H-14 (5' – TAC TCC CTC GGA TA – 3') e H-24 (5' – AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAG – 3') (Ibrahim et al., 2006) para impedir a reconstituição dos sítios clivados pela *Mse*I. A ligação foi realizada num volume final de 60µL contendo os 30µL do DNA digerido pela *Mse*I, 16µM dos oligos pareados, 1X tampão de ligação (50mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 10mM DTT – pH7,5), PEG 6000 6%, 400U de T4 DNA ligase e 10U de *Mse*I a 16°C *overnight*. Os fragmentos de DNA ligados foram purificados com o *QiAquick Purification Kit* (QiAgen) e eluídos em 40µL de água ultra pura estéril.

#### A.4.2. Representação da metilação diferencial

Para a representação das sequências não-metiladas, metade da amostra obtida na etapa anterior (20µL) foi digerida com a enzima dependente de metilação *Mcr*BC com 1X tampão NEB 2 (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT - pH7,9), 10X GTP, 10X BSA e 20U de *Mcr*BC em um volume final de 40µL a 37°C por 4 horas, seguida de 10 minutos a 65°C para a inativação enzimática. Para a representação das sequências metiladas, a outra metade da amostra foi digerida por um coquetel contendo as enzimas sensíveis à metilação *Aci*I, *Hin*P1I, *Hpy*CH4IV e *Hpa*II em um volume final de 70µL com 1X tampão NEB 1 (10 mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT - pH 7.0), 10X BSA e 20U de cada enzima. Depois de 4 horas de incubação a 37°C foram adicionadas mais 10U de cada



enzima e a incubação prosseguiu por mais 2 horas, seguida de 10 minutos a 65°C para a inativação enzimática.

Cada amostra de DNA digerida foi purificada com o *QIAquick Purification Kit* (Qiagen) e eluída em 50µL de água estéril. O DNA foi dosado no espectrofotômetro *Nanodrop® ND-1000* e amplificado pela PCR com o uso de uma das sequências do adaptador como *primer*.

#### A.4.3 Amplificação pela PCR

A reação de amplificação foi conduzida em um volume final de 50µL contendo 50ng de DNA digerido purificado, 0,1µM do oligo H-24, 200µM de dNTPs, 1X *buffer* 1 (com 1,75mM de MgCl<sub>2</sub>) e 2U da enzima *Expand Long Template* (Roche). Nos testes iniciais, as condições de amplificação foram as que encontram-se apresentadas na tabela 2 (SCOMP-GD). Posteriormente, as condições foram de 1 ciclo a 72°C por 5 minutos; 25 ciclos a 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos; 1 ciclo a 72°C por 10 minutos.

**Tabela 2.** Condições de amplificação pela PCR dos fragmentos genômicos.

Ciclos	1 ciclo	15 ciclos	8 ciclos	22 ciclos	1 ciclo
Temperaturas					
94°C		40s	40s	40s	
57°C 65°C		57°C – 30s	57°C – 30s + 1°C / ciclo	65°C – 30s	
68°C	3 min	1min 30s + 1s / ciclo	1min 45s + 1s / ciclo	1min 53s + 1s / ciclo	3min 40s

As amostras amplificadas foram purificadas com o *Qiaquick Purification Kit* (Qiagen) e eluídas em 50µL de água estéril. Os produtos amplificados foram avaliados no equipamento *Bioanalyzer (Agilent Technologies)* para determinar o sucesso da amplificação e a quantidade do DNA amplificado contendo um padrão de rastro ou “smear” difuso (*Agilent DNA 1000 kit*, segundo as recomendações do fornecedor). A quantidade do DNA amplificado foi também avaliada através da leitura em espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000*. As reações de amplificação foram repetidas até se conseguir a quantidade de DNA necessária para a hibridação nas duas lâminas réplicas para cada amostra (1500ng para cada lâmina).

#### A.4.4. Marcação dos fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA amplificados a partir da amostra teste (endometriose) e referência (endométrio eutópico) foram marcados, em réplicas, com cianinas cinco (Cy5) e três (Cy3), respectivamente.

A reação de marcação foi realizada utilizando a tecnologia *Universal Linkage System (ULS) (ULS labeling kit - Agilent Technologies)* que se baseia na molécula ULS, composto de platina ligado a uma variedade de haptenos ou fluoróforos, incluindo as cianinas, que apresenta afinidade por biomoléculas como ácidos nucleicos e proteínas (Figura 3).

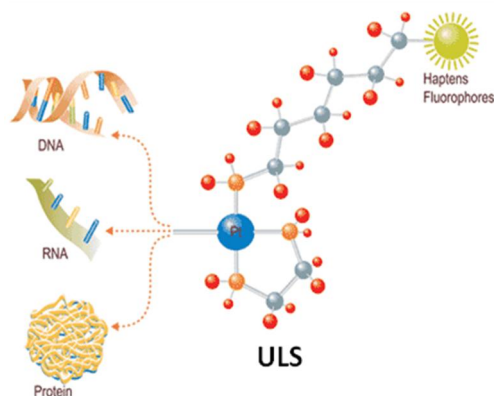


Figura 3. Representação esquemática da molécula ULS (Fonte: Rogers et al., 2008).

As reações de marcação foram realizadas em um volume final de 20 $\mu$ L contendo 16,5 $\mu$ L de DNA genômico (contendo a quantidade recomendada pelo fornecedor para a hibridação na plataforma *Human CpG Island Chip-on-Chip* 244K, *Agilent Technologies*: 1500ng), 1,5 $\mu$ L de ULS-Cy3 ou ULS-Cy5 e 2,0 $\mu$ L de solução de marcação concentrada 10X, de acordo com as recomendações do fabricante. As reações foram incubadas em termociclador a 85°C por 30 minutos seguido de 3 minutos a 4°C.

Posteriormente, os produtos marcados foram purificados usando colunas *KREApure* (*Agilent Technologies*), conforme recomendações do fabricante, para eliminar cianinas que não foram incorporadas. A coluna foi introduzida em um tubo coletor de 2,0mL, o material gelatinoso presente em seu interior foi homogeneizado rapidamente em um vórtex, a tampa foi levemente aberta e a sua extremidade inferior retirada. A coluna foi centrifugada por 1 minuto a 6000 x g, e tampa e filtrado foram descartados. À coluna foram adicionados 300 $\mu$ L de água estéril e uma nova centrifugação a 6000 x g durante 1 minuto foi realizada. O filtrado e o tubo coletor foram descartados e a coluna transferida para um novo tubo de 1,5mL. Os 20 $\mu$ L de

DNA marcado foram introduzidos no centro da coluna e esta foi centrifugada a 6000 x g durante 1 minuto para a coleta do DNA marcado purificado.

Uma etapa de avaliação da eficiência de marcação foi realizada dosando-se o produto purificado da reação de marcação num espectrofotômetro *Nanodrop® ND-1000*. O total de incorporação de cianinas na amostra purificada foi determinado com Cy5 detectado a 650nm e Cy3 detectado a 550nm. Para o cálculo dos picomoles de corante incorporado, a seguinte equação foi usada:

$$\text{Grau de incorporação das cianinas} = \frac{340 \times \text{pmol por } \mu\text{L de cianina} \times 100\%}{\text{ng por } \mu\text{L de DNA genômico} \times 1000}$$

Um nível ótimo de Cy5 deve ficar entre 0,75% e 2,5% e de Cy3 deve ficar entre 1,75% e 3,5%, com Cy3 menos Cy5 entre 1% e 2%.

#### A.4.5 Preparação do DNA genômico marcado para hibridação

O volume total de DNA teste e DNA referência foram combinados e submetidos a uma reação de pré-hibridação em presença de 50,0µL de *Human Cot-1 DNA* (1mg/mL) (*Invitrogen*), 5,2µL de *Agilent Technologies 100X Blocking Agent* (*Agilent Technologies*) e 260µL de *Agilent Technologies 2X Hi-RPM Hybridization Buffer* (*Agilent Technologies*). A reação foi incubada a 95°C por 3 minutos seguida de 37°C por 30 minutos para pré-anelamento, posteriormente transferida para gelo. Em seguida, foi adicionado 130µL do reagente *Agilent Technologies-CGHBlock* (*ULS labeling Kit – Agilent Technologies*) para auxiliar na eliminação de marcações inespecíficas.

#### A.4.6 Hibridação na plataforma *Agilent Technologies' Human CpG Island Chip-on-Chip Set 244K*

A hibridação foi realizada na plataforma *Human CpG Island Chip-on-Chip 244K (Agilent Technologies)*. Esta plataforma contém um microarranjo de sequências anotadas a partir do UCSC hg18 (NCBI *build* 36.1, *March* 2006) e foi delineada para a detecção de alterações da metilação do DNA em alta resolução usando diferentes abordagens (baseadas em enzimas de restrição ou imunoprecipitação da cromatina). As sondas de oligonucleotídeos foram selecionadas para cobrir as sequências genômicas correspondentes a Ilhas CpG definidas segundo critérios do *UCSC genome browser* disponível em <http://genome.ucsc.edu> (comprimento do fragmento de 200pb, conteúdo de GC 50%, razão Obs/Esp CpG = 0.6). Este microarranjo contém aproximadamente 195.000 sondas cobrindo 21 Mb correspondentes a 27.800 ilhas CpG com ~8 sondas por ilha, além de 50.000 sondas adicionais cobrindo regiões não-CpG compreendidas num intervalo de 95pb da ilha. O espaçamento médio entre as sondas é de aproximadamente 100pb.

A hibridação foi realizada pela adição de 490µL da reação de hibridação à lâmina de *microarray* e incubação em estufa a 65°C, 20 rpm por 40 horas em uma câmara de hibridação (*Hybridization Chamber – SureHyb*). Após a hibridação, a lâmina foi lavada primeiramente no *Oligo aCGH Wash Buffer 1* a temperatura ambiente por 5 minutos, sob agitação. A lâmina foi transferida para o *Oligo aCGH Wash Buffer 2* pré-aquecido a 37°C por 1 minuto. Em seguida, a lâmina foi incubada em solução de acetonitrila por 10 segundos e em *Stabilization and Drying Solution* por 30 segundos, ambas a temperatura ambiente.

#### A.4.7 Análise das lâminas

As intensidades dos sinais fluorescentes foram obtidas utilizando o *scanner Agilent* e os dados foram extraídos pelo *software Feature Extraction 10.5.1.1*. Esta etapa do protocolo foi conduzida junto ao Laboratório NeoGene, do Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, em colaboração com a Dr<sup>a</sup> Silvia Regina Rogatto.

Os dados extraídos foram avaliados quanto a parâmetros de qualidade sendo  $DLRSSpread < 0,3$ ,  $BGNoise < 15$ , Intensidade do sinal  $> 90$ ,  $Signal-to-noise > 20$  e Reprodutibilidade  $< 0,2$ .  $BGNoise$  é definido como o desvio padrão dos sinais nos controles negativos incluídos no microarranjo. Altos valores de  $BGNoise$  podem levar a uma baixa razão *signal to noise* e altos valores de DLRSD (*Derivative Log Ratio Standard Deviation*). Outro parâmetro importante é a reprodutibilidade; geralmente, a reprodutibilidade baixa é devida à variação entre as réplicas das sondas e indica que o volume/quantidade de amostra hibridada foi muito pequeno ou que houve problemas durante o processo de rotação da câmara de hibridação. Além destes parâmetros também há a geração de um gráfico de dispersão no qual são plotadas as intensidades dos dois canais (Cy3 e Cy5) corrigidos pelo *background* em cada um dos *spots*. Neste gráfico espera-se uma correlação linear entre os canais. Esta é a avaliação definitiva para se prosseguir com a análise subsequente dos dados gerados, mesmo que alguns dos parâmetros não tenham atingido a qualidade desejada.

A análise posterior dos dados foi baseada em Omura et al. (2008). Sítios específicos de metilação foram obtidos pelo uso do *software Agilent Technologies Genomic Workbench (DNA Analytics 5.0) (Agilent Technologies)*, pela incorporação do *Whitehead Error Model*, que possui uma taxa de falso positivo de aproximadamente 0,5% e falso negativo de aproximadamente 20%. Esses dados

foram gerados após *Blank Subtraction Normalization* (correção de ligação não específica), *Dye-bias (intra-array) Median Normalization* (correção e normalização das intensidades dos *dyes*) e *Inter-array Median Normalization* (correção das variações entre as réplicas). Uma lista de sondas derivadas de cada caso foi assim, gerada. Os dados normalizados foram transformados no logaritmo de base 2. Apenas as sondas concordantes nas duas réplicas foram consideradas como válidas nestes experimentos. As sondas com *Cy5/Cy3 log ratio* 2,0, correspondendo a um sinal diferencial de 4X, foram selecionadas e destas, apenas as com um  $p < 0,001$  foram consideradas como estatisticamente significantes. Posteriormente novas análises foram realizadas incluindo as sondas com  $p\text{-value} < 0,005$  e  $p\text{-value} < 0,05$  sendo todas concordantes para ambas as réplicas de cada caso.

Como o DNA referência neste estudo foi o proveniente do endométrio eutópico da própria paciente, e não de uma amostra referência comercial comum, a análise de cada lâmina (e suas réplicas) foi realizada independentemente. Posteriormente, as listas de genes gerados em cada caso foram comparadas para a seleção dos genes ou regiões que apresentaram metilação diferencial recorrente na endometriose.

Adicionalmente, os dados também foram avaliados no *software GeneSpring 7.3* (experimento de *dye swap*) e *GX 11.0 (Agilent Technologies Technologies)*. Neste último, foi realizado um pré-processamento das lâminas baseada na análise dos componentes principais (PCA), para uma avaliação das relações entre os *arrays*.

#### A.4.8 Análise de metilação do DNA nas linhagens de câncer de cólon HCT116 e DKO

Duas linhagens celulares derivadas de carcinomas colorretais (linhagens HCT116 e DKO) foram utilizadas na etapa de padronização dos ensaios de hibridação. Estas linhagens foram gentilmente cedidas pela Dra Lígia da Veiga Pereira, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, USP. Células HCT116 parentais estabelecidas a partir de câncer de cólon e células DKO que são células HCT116 duplo *knockout* para as DNA metiltransferases 1 e 3b (DNMT1 e DNMT3b) (Han et al., 2007) foram cultivadas em meio McCoy's 5A suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos, à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, para posterior extração do DNA genômico.

O DNA obtido foi utilizado numa estratégia de *dye swap*: inicialmente, 5µg de DNA genômico proveniente de cada linhagem foram digeridos com 50U da enzima de restrição *Mse*I a 37°C *overnight* num volume final de 30µL seguido de 10 min a 65°C para inativação enzimática. Os fragmentos foram subsequentemente digeridos com a enzima *Mcr*BC em 1X tampão NEB 2 (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT - pH7,9), 10X GTP, 10X BSA e 50U da enzima de restrição, em um volume final de 50µL a 37°C por 4 horas, seguida de 10 minutos a 65°C para a inativação enzimática. Para o experimento de *dye swap* cada uma das duas linhagens foram marcadas tanto com Cy3 quanto com Cy5, em duas reações separadas e em seguida hibridadas em duas lâminas: uma amostra proveniente da linhagem HCT116 marcada com Cy3 foi misturada com uma amostra proveniente da linhagem DKO marcada com Cy5 e vice-versa. As etapas de quantificação da intensidade, normalização e análise dos dados estão descritas no item anterior. Os sinais fluorescentes das duas lâminas réplicas foram comparados pela confecção de



um gráfico de dispersão de forma a se obter uma correlação linear, indicando o sucesso do experimento no *software GeneSpring 7.3*.

## B) IDENTIFICAÇÃO DOS PERFIS DIFERENCIAIS DE METILAÇÃO DO DNA NA ENDOMETRIOSE BASEADA NA ESTRATÉGIA DE MS-AP-PCR (*METHYLATION-SENSITIVE ARBITRARILY PRIMED POLYMERASE CHAIN REACTION*)

### B.1 MS-AP-PCR (*Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*)

Como uma abordagem preliminar adicional à hibridação nos microarranjos de ilhas CpG, a análise de MS-AP-PCR foi conduzida em dois de três pares de amostras de endometriose/endométrio eutópico (casos 089 e 116) também selecionadas junto ao Banco de Tecidos e Fluidos Corporais de Pacientes com Endometriose do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina – USP, São Paulo.

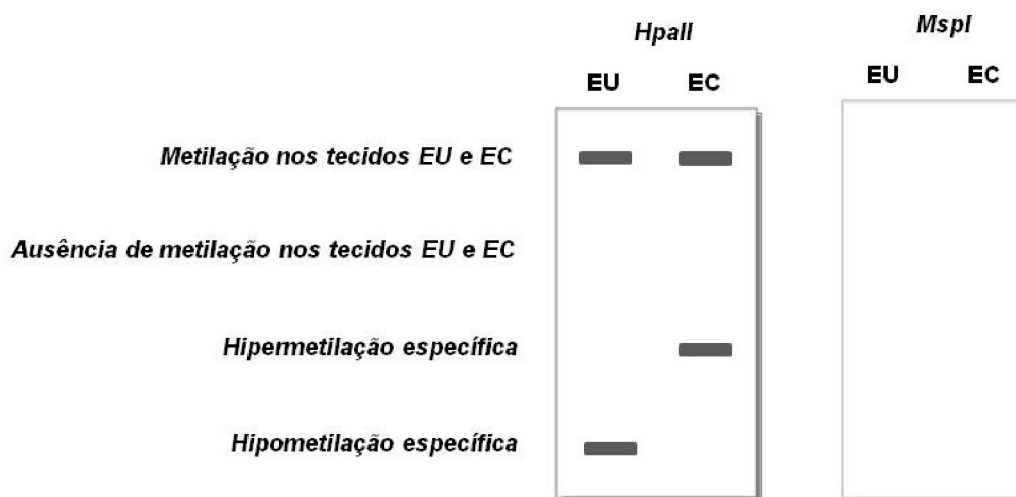
Aproximadamente 2µg de DNA proveniente das amostras pareadas foi digerido isoladamente com as enzimas de restrição *MspI* e *HpaII* (100U), segundo protocolo descrito por Costa et al. (2006) com modificações, a 37°C durante 16 horas seguido de 10 minutos a 65°C para inativação enzimática. Em seguida, as amostras foram submetidas a amplificações empregando-se um oligonucleotídeo iniciador de 20mers isoladamente (MLG2: 5' - AAC TCC CAC TCC AAC CCC GG – 3') (Costa et al., 2006).

As reações foram realizadas num volume final de 25µL contendo 25pmol do *primer* MLG2, 200µM de dNTPs com 7'-deaza-dGTP (na proporção de 1:4 dGTP), 1X tampão (20mM de Tris-HCl pH 8.4, 50mM de KCl), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> e 1U

de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). As condições da amplificação foram de 1 ciclo a 94°C por 2 minutos; 5 ciclos a 94°C por 30 segundos, 40°C por 1 minuto e 72°C por 90 segundos; 30 ciclos a 94°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos e 72°C por 1 minuto; 1 ciclo a 72°C por 4 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% não-desnaturante e visualizados após coloração com nitrato de prata (Sanguinetti et al., 1994).

As bandas candidatas à metilação diferencial foram identificadas pela comparação direta entre os produtos amplificados a partir do DNA obtido de endométrio eutópico e da endometriose (Figura 4).



**Figura 4.** Interpretação dos resultados da MS-AP-PCR. Foram considerados apenas os fragmentos que contêm pelo menos um sítio CCGG flanqueado pelo oligonucleotídeo randômico. Neste contexto, a digestão com *MspI* é considerada controle negativo do experimento. A metilação diferencial é observada pela amplificação de uma banda específica após digestão com *HpaII* e ausência de amplificação após digestão com *MspI*. A amplificação de um produto após digestão com *HpaII* em ambas as amostras corresponde a fragmentos que contêm dinucleotídeos CpG metilados. A ausência de amplificação após a digestão com *HpaII* em ambas as amostras corresponde a fragmentos não metilados. A detecção de uma banda apenas no DNA da endometriose (EC) após digestão com *HpaII* indica a hipermetilação adquirida durante a origem/progressão da doença e a ausência de um produto no perfil do DNA proveniente da endometriose indica a perda de metilação em sítios CCGG nas células endometrióticas.

## B.2 Recuperação de bandas diferencialmente metiladas a partir de géis de poliacrilamida

As bandas diferencialmente metiladas foram cortadas e introduzidas em microtubos de 0,5mL previamente furados e inseridos em microtubos de 1,5mL. Após centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos, os microtubos de 0,5mL foram descartados. Ao conteúdo coletado no microtubo de 1,5mL, foi adicionado 40µL de água ultra-pura estéril. Os tubos foram fervidos por aproximadamente 3 minutos e o DNA recuperado foi armazenado a -20°C.

Para conferir se a recuperação foi realizada com sucesso e obter maior quantidade do fragmento para posterior sequenciamento, o fragmento de DNA recuperado foi amplificado por PCR nas mesmas condições empregadas anteriormente. O produto desta reação foi avaliado após a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% seguido de coloração com nitrato de prata.

## B.3 Clonagem

Os fragmentos recuperados foram clonados empregando-se o *pGEM-T Easy Vector System* (Promega) e transformados em células competentes DH5 . A reação de ligação ao vetor foi conduzida num volume de 10µL contendo 1X tampão de ligação (30mM de Tris-HCl pH 7,8, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 10mM de DTT, 1mM de dATP e PEG 5%), 50ng de vetor e 3U de T4 DNA ligase e mantida a 22°C *overnight*.

Uma etapa de amplificação pela PCR foi conduzida para avaliar o sucesso da ligação. As condições da reação foram de tampão 1X (20mM de Tris-HCl pH 8.4, 50mM de KCl), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 125µM de cada dNTP, 2,0pmol dos oligonucleotídeos M13 *forward* (5' – GTA AAA CGA CGG CCA G - 3') e *reverse* (5' – CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3') e 0,5U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), num

volume final de 15µL. As condições de amplificação foram de 1 ciclo a 95°C por 3 minutos; 35 ciclos a 95°C por 45 segundos, 55°C por 40 segundos e 72°C por 55 segundos; 1 ciclo a 72°C por 7 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e coloração com nitrato de prata.

Confirmada a ligação, foi realizada a transformação em células competentes DH5 . Aproximadamente 50µL da suspensão bacteriana mantidas a -80°C foram descongeladas em uma cuba com gelo, a elas foram adicionadas aproximadamente 3µL da reação de ligação e mantidas no gelo por mais 20 minutos. Em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico durante 50 segundos a 42°C e imediatamente transferidas para a cuba com gelo. Ao tubo contendo as células foram adicionados 250µL de meio SOC e incubado a 37°C durante 1 hora e 30 minutos a 160rpm. Após este período em meio líquido, as células foram transferidas para o cultivo em meio sólido em placas de Petri previamente preparadas com meio LB-Ágar, ampicilina numa concentração final de 100µg/mL, 150µL de IPTG (isopropil- -D-galactopiranosídeo) 100mM e 40µL de X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- -D- galactopiranosídeo) 2%. Logo após, as placas foram incubadas a 37°C *overnight*.

As colônias brancas foram transferidas para tubos de 0,5mL contendo 200µL de meio LB com ampicilina 100µg/mL e incubadas a 37°C por 5-6 horas. Após a incubação, uma nova reação de PCR foi realizada utilizando como amostra o sobrenadante de cada tubo. As condições da reação foram de tampão 1X (20mM de Tris-HCl pH 8.4, 50mM de KCl), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 125µM de cada dNTP, 133nM de cada oligonucleotídeos M13 e 0,5U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), num volume final de 15µL. As condições de amplificação foram de 1 ciclo a 95°C por 3

minutos; 35 ciclos a 95°C por 45 segundos, 55°C por 40 segundos e 72°C por 55 segundos; 1 ciclo a 72°C por 7 minutos. Os produtos da amplificação foram avaliados após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e coloração com nitrato de prata (Sanguinetti et al., 1994). Após a purificação dos produtos clonados e amplificados pela PCR, os mesmos foram sequenciados.

#### B.4 Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas com o *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v.3.1 (Applied Biosystems)* e o par de oligonucleotídeos iniciadores M13, sendo cada um utilizado em reações isoladas. As amostras foram carregadas em um sequenciador automatizado de DNA ABI 3100 (*Applied Biosystems*). Os dados do sequenciamento foram avaliados quanto à sua qualidade no *software* phred/Phrap (<http://www.phrap.org>) (Ewing e Green, 1998). Depois de excluída a sequência do vetor, somente foram consideradas na análise aquelas sequências que mostraram similaridade com regiões genômicas humanas quando analisadas nas ferramentas BLAST (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) e BLAT (disponível em <http://www.genome.ucsc.edu/gci-bin/hgblat>), e as sequências que possuíam 90% das bases do fragmento sequenciado apresentando um *score* de qualidade de no mínimo 15. Este *score* de qualidade é amplamente utilizado para se excluir artefatos do sequenciamento e diminuir a probabilidade da determinação incorreta de bases. As sequências obtidas foram avaliadas segundo parâmetros que definem uma ilha CpG, bem como a sua posição relativa no genoma humano a genes conhecidos e/ou ilhas CpG já caracterizadas (ferramenta *CpG Plot*, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html>). Em adição, o fragmento

deveria conter pelo menos um sítio CCGG (*HpaII*). Finalmente, as prováveis sequências diferencialmente metiladas foram selecionadas como alvo de um ensaio baseado na estratégia de sequenciamento do DNA modificado pelo bissulfito de sódio para posterior validação em um número maior de amostras.

## **B.5 Confirmação dos dados de MS-AP-PCR por sequenciamento do DNA modificado pelo bissulfito de sódio**

A estratégia de sequenciamento do DNA modificado pelo bissulfito de sódio foi realizada para a confirmação dos dados obtidos após a MS-AP-PCR, no fragmento referente ao gene *COL6A2*.

### **B.5.1 Modificação do DNA pelo bissulfito de sódio**

A modificação do DNA pelo bissulfito de sódio foi realizada segundo protocolo descrito por Paulin et al. (1998), com modificações. Aproximadamente 2µg do DNA genômico foram diluídos em água ultrapura estéril para completar um volume final de 18µL. Este DNA foi desnaturado pela adição de 2µL de uma solução de NaOH 3M (para obter uma concentração final de 0,3M) a 40°C durante quinze minutos, ao abrigo da luz. Adicionaram-se 208µL da solução de bissulfito de sódio 4M/uréia 6,25M e 12µL de hidroquinona 10mM (concentração final de 0,5mM) ao DNA. Ambas as soluções foram preparadas imediatamente ao uso. O conteúdo foi gentilmente homogeneizado por inversão e submetido a 20 ciclos de 15 minutos a 55°C, separados por um período de desnaturação de 30 segundos a 95°C em um termociclador.

Ao DNA resultante do processo de modificação pelo bissulfito de sódio foi adicionado 1mL de resina (*Kit Wizard DNA Clean-Up System* - Promega), homogeneizados por inversão. Em seguida, fazendo uso do equipamento *Vaccum Manifold* (Promega), uma seringa de 3mL desprovida de êmbolo foi adaptada a uma mini-coluna e o DNA ligado à resina foi a ela transferido. Adicionou-se, então, 2mL de isopropanol 80% que foram passados através da mini-coluna por pressão com o auxílio de uma bomba de vácuo. Após desconectada, a mini-coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5mL e centrifugada a 14000rpm durante três minutos para remoção do excesso de álcool. A eluição foi realizada pela adição de 45µL de água (pré-aquecida a 65-80°C) à mini-coluna. Passado um minuto, centrifugou-se a mini-coluna adaptada ao tubo de microcentrífuga durante três minutos para que o DNA pudesse ser recuperado. A mini-coluna foi removida e descartada.

A modificação do DNA foi completada pela adição de 5µl de NaOH 3M (concentração final de 0,3M) a temperatura ambiente por 15 minutos para a dessulfonação das uracilas. A precipitação foi realizada pela adição de 30µL de acetato de amônio 5M (pH 7,0) aguardando 5 minutos para a completa deaminação. Na sequência, acrescentou-se 350µL de etanol 100% gelado e 1,0µL de glicogênio (20µg/ml) incubando o DNA a -20°C *overnight*. Para a ressuspensão, este conteúdo foi centrifugado por 20 minutos a 14000rpm a temperatura ambiente. Depois de removido o sobrenadante, adicionou-se ao DNA 500µL de etanol 70% (temperatura ambiente) e procedeu-se nova centrifugação por 20 minutos a 14000rpm. Dispensou-se o álcool e os tubos foram mantidos invertidos para secar o sedimento de DNA. Após a secagem, o

precipitado foi ressuspenso em 50µL de tampão de eluição estéril e mantido a temperatura ambiente por uma hora.

Alternativamente, a modificação do DNA pelo bissulfito de sódio foi realizada empregando-se o *EpiTect Bisulfite kit* (Qiagen), conforme recomendações do fornecedor.

### B.5.2 Análise do padrão metilação do gene *COL6A2*

O seguinte par de oligos para o sequenciamento do DNA modificado pelo bissulfito de sódio foram obtidos pela ferramenta *MSPPrimer* (<http://www.mspprimer.org/cgi-mspprimer/design.cgi>) (Brandes et al., 2007) para o gene *COL6A2*. As sequências destes iniciadores foram: *BIS-sense(1)* 5' GGTGGGTTTAGGTGG 3' e *BIS-antisense(1)* 5' CCCTTAATAACAACCTACCCTAAAA 3' que origina um produto de 320pb.

Foram testadas diferentes condições de reação pelo emprego das DNA polimerases *AmpliTaq Gold* (*Applied Biosystems*), *Biotools* (*Biotools Brasil*), *HosStar Hifidelity* (*Qiagen*), *Deep Vent* (*New England Biolabs*), *Accuprime Taq DNA Polymerase* (*Invitrogen*), *GoTaq* (*Promega*) ou *MasterMix* (*Promega*) e adição de betaína, 7'-deaza-dGTP, DMSO e/ou triton X-100, além de diferentes condições de amplificação.

A origem e especificidade dos produtos da PCR foram avaliados em gel de poli-acrilamida a 6% e coloração por nitrato de prata (Sanguinetti et al., 1994).



Adicionalmente, novos oligos iniciadores foram desenhados na ferramenta *Methyl Primer Express Software 1.0 (Applied Biosystems)* e serão testados. As sequências destes novos iniciadores foram:

§ *BIS-sense(2)* 5' GGAGTGGGGATTTTAGATAGAG 3' e *BIS-antisense(2)* 5' ATACAAAATTCCCCCATC 3' que origina um produto de 348pb;

§ *BIS-sense(3)* 5' GTTGGGGGATTGTGATTAG 3' e *BIS-antisense(3)* 5' TCAAAAACCTCCTACAAAACCTACC 3' que origina um produto de 282pb.

# Resultados

## A) IDENTIFICAÇÃO DOS PERFIS DIFERENCIAIS DE METILAÇÃO DO DNA NA ENDOMETRIOSE BASEADA NA TRIAGEM GENÔMICA DE MICROARRANJOS DE ILHAS CpG

O protocolo para a identificação dos perfis diferenciais de metilação do DNA na endometriose baseada na triagem genômica de microarranjos de ilhas CpG foi primeiramente padronizado baseado em um experimento de *dye swap* (após a realização de testes preliminares conforme descrito no Apêndice), em réplicas, com o DNA proveniente das linhagens celulares HCT116 e DKO, após o enriquecimento da fração não metilada.

Neste experimento, as eficiências das marcações com ambas as cianinas foram adequadas (1,66% e 1,45% para Cy5; 2,15 e 1,99 para Cy3) (ANEXO V). Além disso, todos os parâmetros de qualidade obtidos estavam incluídos nos limites aceitáveis, apontando que as etapas de marcação e hibridação foram realizadas com sucesso (ANEXO VI).

As Figuras 5 e 6 apresentam os gráficos da distribuição dos sinais fluorescentes após a hibridação, sem normalização, obtidos no *software GeneSpring 7.3* referentes ao experimento de *dye swap* nas amostras das linhagens HCT116 (marcada com Cy3 na réplica 1 e Cy5 na réplica 2) e DKO (marcada com Cy5 na réplica 1 e Cy3 na réplica 2), indicando a reprodutibilidade do experimento. Pode-se notar na Figura 5 que não houve marcação preferencial com os compostos fluorescentes utilizados. Na Figura 6 pode-se notar que apenas 7% dos *spots* dos microarranjos não apresentaram reprodutibilidade mostrando que a presença de artefatos experimentais é baixa e, portanto, que o protocolo encontrava-se bem embasado e que poderia ser aplicado nas demais amostras do estudo. A qualidade

das hibridações também foi avaliada pelo valor de  $R^2$  (correlação entre verde/vermelho normalizado) entre as réplicas de 0,9462 (valor 1 indica 100%).

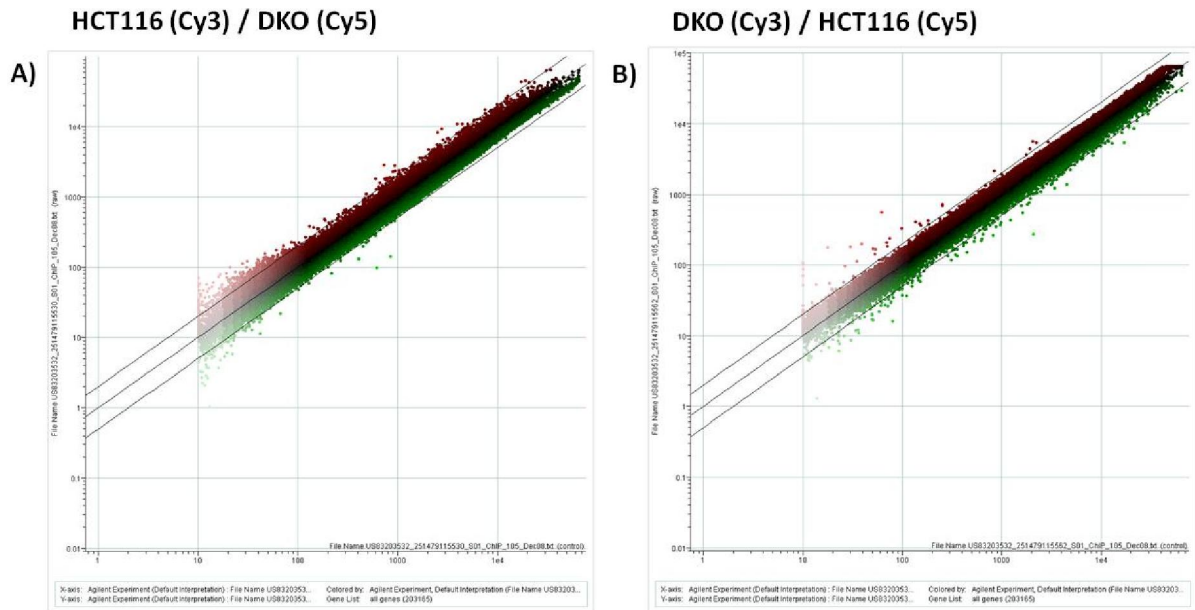


Figura 5. Os gráficos de dispersão representam os valores de fluorescência de Cy3 e Cy5 em cada uma das lâminas do experimento de *dye swap*, gerados no *software GeneSpring 7.3*. (A) HCT116 foi marcada com Cy3 (verde) e DKO foi marcada com Cy5 (vermelho); (B) HCT116 foi marcada com Cy5 (vermelho) e DKO foi marcada com Cy3 (verde).

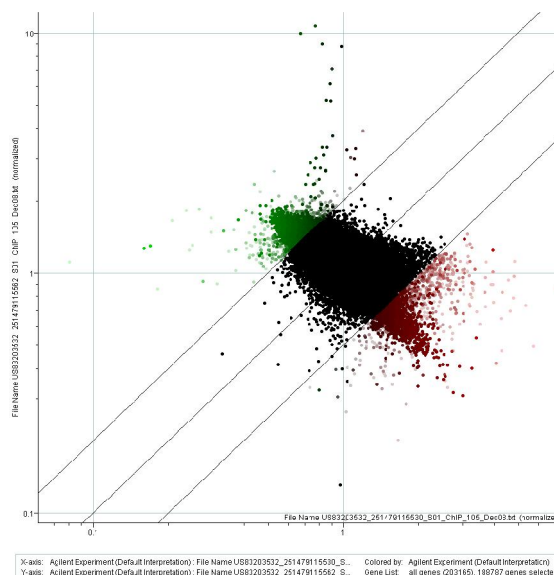


Figura 6. O gráfico de dispersão representa os *log ratio* de Cy5/Cy3 do experimento de *dye swap* em ambas as lâminas, gerados no *software GeneSpring 7.3*.

Posteriormente, a hibridação na plataforma *Human CpG Island Chip-on-Chip* 244K (*Agilent Technologies*) foi concluída em nove dos 18 casos selecionados inicialmente para o estudo (casos: 116, 169, 190, 192, 199, 207, 214, 255 e 256) após o enriquecimento da fração metilada. Destes, cinco casos foram também finalizados após o enriquecimento da fração não metilada (casos: 116, 190, 207, 214 e 255). Um par de amostras (caso 185) foi excluído das análises posteriores conforme descrito no Apêndice. Entre as nove amostras de endometriose empregadas para a hibridação da fração metilada, a idade variou entre 28 a 39 anos (média de  $33,5 \pm 4,1$  anos) enquanto o CA125 variou entre 0 e 177, três possuíam estadiamento 1-2 e seis, 3-4, quatro eram amenorréicas e sete faziam uso de algum medicamento hormonal. Entre as cinco amostras de DNA que foram enriquecidas com a fração não metilada, a idade variou entre 29 e 39 anos (média  $34,6 \pm 3,7$  anos) enquanto o CA125 também variou 0 e 177, duas possuíam estadiamento 1-2 e três, 3-4, duas eram amenorréicas e quatro estavam sob tratamento hormonal.

Após o enriquecimento de ambas as frações, as amostras foram marcadas com fluorescência. As eficiências de todas as amostras marcadas com Cy5 de ambas as frações ficaram com um valor ótimo (entre 0,75% e 2,5%), entretanto as marcações com Cy3 em 57% das reações de marcação (16 das 28 amostras marcadas, sendo 10 provenientes da fração metilada e seis da não metilada) ficaram ligeiramente abaixo do limite inferior desejado de 1,75% (ANEXO V).

A avaliação da qualidade das 28 lâminas após a hibridação indicaram que os parâmetros *BGNoise* e reprodutibilidade estavam incluídos nos limites aceitáveis. Os demais parâmetros de qualidade mostraram algumas variações sendo que alguns ficaram abaixo ou acima dos limites considerados como ótimos, principalmente quanto ao parâmetro DLRSD (ANEXO VI). Entretanto, todos os

experimentos foram considerados como aceitáveis em função da análise do gráfico de dispersão (gerado pelo *software Feature Extraction*) entre os sinais de Cy3 e Cy5 corrigidos pelo *background* mostrarem uma correlação linear.

Após a análise pelo *software Agilent Technologies Genomic Workbench (DNA Analytics 5.0)* foi gerada uma lista contendo as informações de 198.303 sondas presentes nesta plataforma. A Tabela 3 indica os valores de  $R^2$  obtidos entre as réplicas mostrando que as hibridações foram altamente reprodutíveis. Foi realizada uma primeira seleção com *cut-off* de *log ratio* 2,0 e  $p < 0,001$ , apenas das sondas concordantes em ambas as réplicas. Um total de 700 genes foram identificados como diferencialmente metilados nas nove amostras de endometriose enriquecidas com a fração metilada e 33 genes, nas cinco amostras enriquecidas com a fração não metilada. A quantidade de genes cujas sondas apresentaram metilação diferencial obtida em cada caso com essas condições encontra-se relacionada nas Tabelas 4 (fração metilada) e 5 (fração não metilada).

Tabela 3. Valores de correlação entre as réplicas ( $R^2$ ).

		Casos								
		116	169	190	192	199	207	214	255	256
Casos	116	0,9758 (M) 0,9537 (U)								
	169		0,8677							
	190			0,9663 (M) 0,8975 (U)						
	192				0,9215					
	199					0,9570				
	207						0,9130 (M) 0,9366 (U)			
	214							0,9708 (M) 0,9273 (U)		
	255								0,9746 (M) 0,9021 (U)	
	256									0,9822

M – fração metilada; U – fração não metilada

**Tabela 4.** Quantidade de genes obtidos em cada caso referente à fração metilada (*log ratio* 2,0 e  $p < 0,001$ ).

	Casos								
	116	169	190	192	199	207	214	255	256
N° genes	96	47	119	50	136	36	178	13	25

**Tabela 5.** Quantidade de genes obtidos em cada caso referente à fração não metilada (*log ratio* 2,0 e  $p < 0,001$ ).

	Casos				
	116	190	207	214	255
N° genes	2	11	13	7	0

Posteriormente, os genes obtidos foram comparados entre todos os casos de uma mesma fração para a pesquisa de regiões mostrando padrões de metilação alterados recorrentes na endometriose. Foi obtido um total de 38 genes ou regiões cromossômicas significantes em pelo menos dois casos avaliados na fração metilada (Tabela 6). Destes 38 genes, seis eram recorrentes em pelo menos três casos (*BMP4*, *DMRTA2*, *EMX2*, *GFI1*, *HOXD8* e *REC8*) e um gene, em quatro amostras (gene *HOXD9*). Como a quantidade de genes gerados em cada caso na fração não metilada foi relativamente baixo, apenas um deles, o gene *MAB21L2* [*mab-21-like 2 (C. elegans)*], mostrou significância em mais de um caso (casos 190 e 207). Este gene foi classificado como envolvido em processos relacionados ao desenvolvimento de organismos multicelulares, desenvolvimento do sistema nervoso central e regulação positiva da proliferação celular (*NCBI Gene Ontology*).



Deve-se ressaltar que, embora os genes listados mostrassem significância em mais de um caso analisado, isso não significou que foi a mesma sonda representada já que cada ilha CpG é representada por pelo menos 8 sondas. O ANEXO VII relaciona todas as sondas por genes significantes em pelo menos dois casos.







Tabela 6. (continuação)

Genes	Função ( <i>NCBI Gene Ontology</i> )	Processos ( <i>NCBI Gene Ontology</i> )	Casos									
			116	169	190	192	199	207	214	255	256	
<i>NRXN1</i>	<i>metal ion binding, protein binding, receptor activity</i>	<i>cell adhesion; axon guidance</i>										
<i>PAX6</i>	<i>sequence-specific DNA binding, protein binding, transcription factor activity,</i>	regulation os transcription, cell differentiation, central nervous system development										
<i>PCGF1</i>	<i>metal ion binding, protein C-terminus binding</i>	<i>regulation of transcription</i>										
<i>PLEC</i>	<i>structural constituent of muscle</i>	<i>hemidesmosome assembly</i>										
<i>PRDM16</i>	<i>SMAD binding, metal ion binding, protein binding, sequence-specific DNA binding, transcription activator activity</i>	<i>negative regulation of transcription, DNA-dependent; neurogenesis; regulation of cellular respiration; entre outros</i>										
<i>REC8</i>	<i>protein binding</i>	<i>meiosis; sister chromatid cohesion; synapsis; entre outros</i>										
<i>VPS52</i>	-	<i>protein transport</i>										
<i>WDR5</i>	<i>histone methyltransferase activity (H3-K4 specific), protein binding</i>	<i>chromatin modification; histone H3-K4 methylation; regulation of transcription</i>										
<i>WDR90</i>	-	-										

Como os parâmetros escolhidos nesta primeira análise foram muito restritivos, os mesmos foram alterados para *log ratio* 2,0 e  $p < 0,005$  para todas as sondas, mantendo-se somente as sondas concordantes em ambas as réplicas para se garantir a especificidade do resultado obtido. A quantidade de genes obtidos em cada caso, sob essas condições, encontra-se relacionada na Tabela 7 (fração metilada). Sob estas condições, um total de 843 genes foram identificados como hipermetilados nas nove amostras de endometriose enriquecidas para a fração metilada.

**Tabela 7.** Quantidade de genes obtidos em cada caso referente fração metilada (*log ratio* 2,0 e  $p < 0,005$ ).

	Casos								
	116	169	190	192	199	207	214	255	256
N° genes	110	89	129	61	144	42	214	16	38

Para a fração não metilada, a análise considerando-se um valor de  $p < 0,005$ , revelou que a quantidade de genes hipometilados na endometriose aumentou apenas ligeiramente (total de 47 genes). Assim, para essa fração foi adicionado também os genes e regiões com  $p < 0,05$ , resultando em 82 genes hipometilados. Sob estas condições, um gene adicional [*CBX8 - chromobox homolog 8 (Pc class homolog, Drosophila)*] também foi encontrado representado em mais de um caso (inclusive pela mesma sonda A\_17\_P10485568). Este gene foi classificado como envolvido em processos de montagem, desmontagem e modificação da cromatina, ubiquitinação de histonas e regulação da transcrição (*NCBI Gene*

*Ontology*). Uma pesquisa pelos genes com *log ratio*  $\geq 2$  (hipermetilados na endometriose), foi também realizada, mas nenhum resultou em significância.

Após a pesquisa dos genes concordantes em dois ou mais casos, a fração metilada resultou em um acréscimo de 15 genes (Tabela 8 e ANEXO VIII), totalizando 53 genes concordantes.

Além destes genes e regiões concordantes foi encontrado na fração metilada alguns genes correspondentes a famílias gênicas, como a família *HOXA*, que estavam presentes nas listas geradas de vários casos (Tabela 9).





Tabela 8. (continuação)

Genes	Funções ( <i>NCBI Gene Ontology</i> )	Processos ( <i>NCBI Gene Ontology</i> )	Casos											
			116	169	190	192	199	207	214	255	256			
<i>SORCS2</i>	<i>neuropeptide receptor activity</i>	<i>neuropeptide signaling pathway</i>												
<i>TNRC18</i>	<i>DNA binding</i>	-												
<i>ZIC5</i>	<i>DNA binding, metal ion binding</i>	<i>cell differentiation; multicellular organismal development; nervous system development;</i> entre outros												
<i>ZNF295</i>	<i>DNA binding, metal ion binding, protein binding</i>	<i>regulation of transcription</i>												

Tabela 9. Genes significantes constituindo famílias gênicas em cada caso da fração metilada (*log ratio* 2,0 e *p*<0,005).

Cromossomo	Primary Annotation	Localização	ID	Primary Annotation Type	Normalized Log Ratio	P-value	Casos								
							116	169	190	192	199	207	214	255	256
chr7	<i>HOXA3</i>	chr7:27121445-27121500	A_17_P05377653	ag_LACat PROMOTER	39.463.649	7,88E-08									
	<i>HOXA5</i>	chr7:27150566-27150625	A_17_P05377906	ag_LACat PROMOTER	5.153.473	2,64E-12									
	<i>HOXA6</i>	chr7:27152115-27152159	A_17_P05377914	ag_LACat INSIDE	25.330.179	6,63E-04									
	<i>HOXA7</i>	chr7:27166217-27166266	A_17_P05378034	ag_LACat PROMOTER	42.253.275	3,89E-05									
	<i>HOXA13</i>	chr7:27205523-27205567	A_17_P05378349	ag_LACat INSIDE	39.478.621	4,32E-10									
chr14	<i>SIX1</i>	chr14:60173749-60173793	A_17_P16707843	ag_LACat DOWNSTREAM	38.171.353	5,20E-07									
	<i>SIX4</i>	chr14:60260021-60260065	A_17_P09331015	ag_LACat INSIDE	32.941.277	7,27E-05									

Na comparação dos genes mostrando padrão de metilação diferencial entre o endométrio eutópico e ectópico neste estudo com os dados descritos na literatura (Tabela 1), foi observado que em cinco destes foi detectada pelo menos uma sonda alterada na fração metilada (Tabela 10) e em seis na fração não metilada (Tabela 11).

**Tabela 10.** Sondas (por gene) na fração metilada mostrando concordância com dados da literatura.

Gene	Nº de sondas concordantes/nº de sondas totais	Caso	<i>Log ratio</i> *	<i>P-value</i>
<b>Martini et al., 2002</b>				
<i>CDKN2A</i>	1/54	116	11.742.421	0.0068974323
	1/54	169	10.712.589	0.010010833
	1/54	190	14.544.954	0.0011473502
<i>MLH1</i>	1/6	190	18.506.863	6,98E+02
<b>Wu et al., 2005; Lee et al., 2009</b>				
<i>HOXA10</i>	1/27	199	18.341.138	5,05E+02
	1/27	256	16.595.093	0.0013756524
<b>Wu et al., 2006b</b>				
<i>PGR</i>	1/26	255	26.648.808	0.006921476
<b>Xue et al., 2007b</b>				
<i>NR5A1</i>	2/29	116	-10.147.988	0.8033737
			-19.516.536	0.9949302
	2/29	190	-23.946.793	0.8533809
			-18.161.434	0.99153113
	2/29	192	-38.005.102	0.99998516
			-2.234.913	0.9595524
	1/29	199	-18.428.458	0.9865265
	5/29	207	-27.835.014	0.94891495
			-22.044.578	0.98392415
			-11.151.716	0.8273932
			-10.055.925	0.80920434
			-14.526.695	0.9517031
	7/29	255	-15.809.366	0.9718615
			-10.995.392	0.62104714
			-10.746.372	0.86068285
-10.336.368			0.83203435	
-14.315.577			0.9480826	
-11.553.048			0.88421667	
-11.524.798			0.7612831	

\* foram considerados valores de *log ratio* 2,0 ou -2,0; valores positivos referem à hipermetilação e negativos, à hipometilação

**Tabela 11. Sondas (por gene) na fração não metilada mostrando concordância com dados da literatura.**

Gene	N° de sondas concordantes/n° de sondas totais	Caso	<i>Logratio</i> *	<i>P-value</i>
<b>Martini et al., 2002</b>				
<i>CDKN2A</i>	6/54	116	-15.545.367	0.98742193
			-16.737.566	0.9892111
			-12.777.284	0.9598651
			-15.470.811	0.972368
			-18.011.857	0.9896101
			-12.421.694	0.9550351
	7/54	190	-11.346.229	0.9673821
			-21.293.848	0.99878734
			-15.237.035	0.99800175
			-16.796.118	0.9982604
			-14.259.379	0.9946215
			-11.540.458	0.95853394
	8/54	207	-10.234.118	0.95612013
			-10.675.434	0.96791184
			-13.526.495	0.9917393
			-11.867.155	0.97404397
			-10.927.231	0.96482295
			-23.984.814	0.99982816
			-20.289.333	0.9995446
	7/54	255	-22.381.885	0.99977845
			-17.131.281	0.9987933
			-12.707.268	0.9641196
			-23.551.593	0.99800575
			-28.746.243	0.99932015
			-19.858.953	0.9952314
			-10.327.119	0.9219026
	-15.171.019	0.9807693		
			-12.303.759	0.9551774

Tabela 11. (continuação)

Gene	N° de sondas concordantes/n° de sondas totais	Caso	<i>Logratio</i> *	<i>P-value</i>
<b>Wu et al., 2005; Lee et al., 2009</b>				
<i>HOXA10</i>	4/27	116	-20.160.837	0.20268309
			-12.345.443	0.43186405
			-17.678.962	0.55445796
			-12.087.288	0.5071893
	3/27	190	-27.978.597	0.21906357
			-12.042.298	0.58133465
			-19.905.049	0.13318631
	3/27	207	-12.448.262	0.3260706
			-13.582.097	0.73612416
			-11.434.354	0.7512488
	3/27	214	-3.111.071	0.3861067
			-16.326.159	0.91436803
			-10.462.651	0.9585506
	5/27	255	-13.065.578	0.302025
			-13.545.512	0.60224485
			-22.015.646	0.971192
-12.133.821			0.302025	
-10.447.308			0.8273988	

Tabela 11. (continuação)

Gene	N° de sondas concordantes/n° de sondas totais	Caso	<i>Logratio</i> *	<i>P-value</i>
<b>Wu et al., 2006b</b>				
<i>PGR</i>	8/26	116	-20.062.826	0.8127958
			-22.680.004	0.86634064
			-12.804.079	0.6884243
			-12.754.723	0.8389049
			-10.031.496	0.41166055
			-14.493.244	0.6951111
			-19.510.766	0.4349941
	3/26	190	-23.907.921	0.20268309
			-11.138.698	0.32216042
			-13.841.957	0.403124
	10/27	207	-15.130.937	0.4219611
			-14.136.201	0.27918684
			-11.047.468	0.788661
			-2.913.694	0.18943848
			-13.454.809	0.94498813
			-14.641.933	0.7391673
			-30.434.844	0.7387073
			-23.649.578	0.705728
			-13.728.771	0.55604714
	5/27	214	-4.541.725	0.18943848
			-15.976.017	0.8543916
			-13.061.182	0.6326261
			-15.957.255	0.60355055
			-17.309.673	0.67750424
	3/27	255	-43.334.637	0.33288622
			-2.820.873	0.5715726
			-12.730.497	0.7804531
			-12.237.581	0.9173819
			-12.719.344	0.302025
<b>Xue et al., 2007a</b>				
<i>ESR2</i>	1/10	214	16.116.488	0.0012572386
	1/10	255	10.430.131	0.019959033
<b>Xue et al., 2007b</b>				
<i>NR5A1</i>	1/29	190	15.013.483	0.13318631
	2/29	207	13.040.934	3,55E+02
			2.808.772	0.18943848

Tabela 11. (continuação)

Gene	N° de sondas concordantes/n° de sondas totais	Caso	<i>Log ratio</i> *	<i>P-value</i>
<b>Wu et al., 2007b</b>				
<i>CDH1</i>	1/12	116	-22.265.663	0.95178384
	2/12	190	-10.410.604	0.7852389
			-24.565.103	0.4447872
	4/12	207	-24.467.309	0.75457656
			-10.352.557	0.5377804
			-17.837.912	0.8190714
			-12.474.533	0.41178885
	4/12	214	-14.983.577	0.6909985
			-12.529.649	0.8608096
			-10.920.923	0.83338284
-20.406.818			0.47369108	

\* foram considerados valores de *log ratio* 2,0 ou - 2,0; valores positivos referem à hipometilação e negativos, à hipermetilação

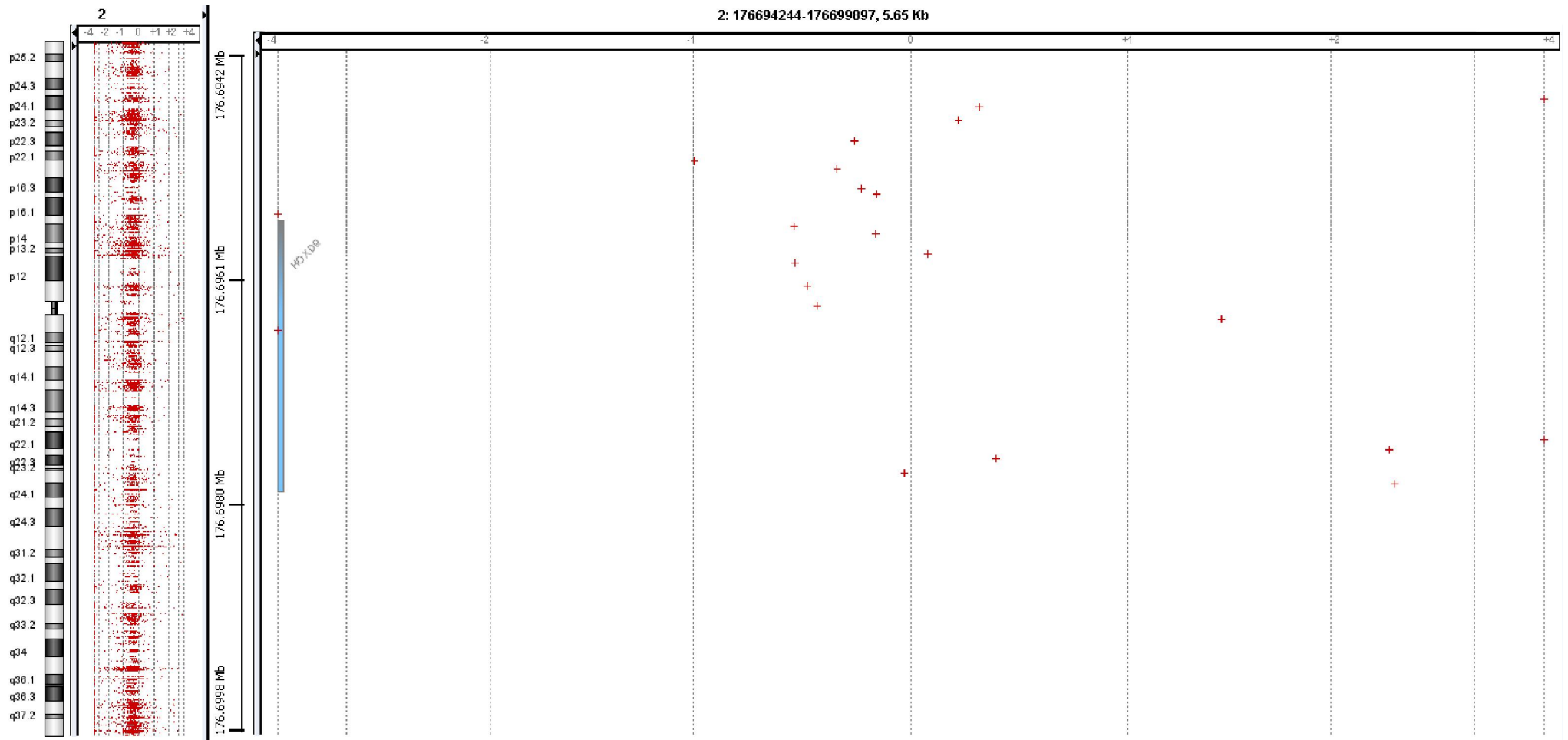
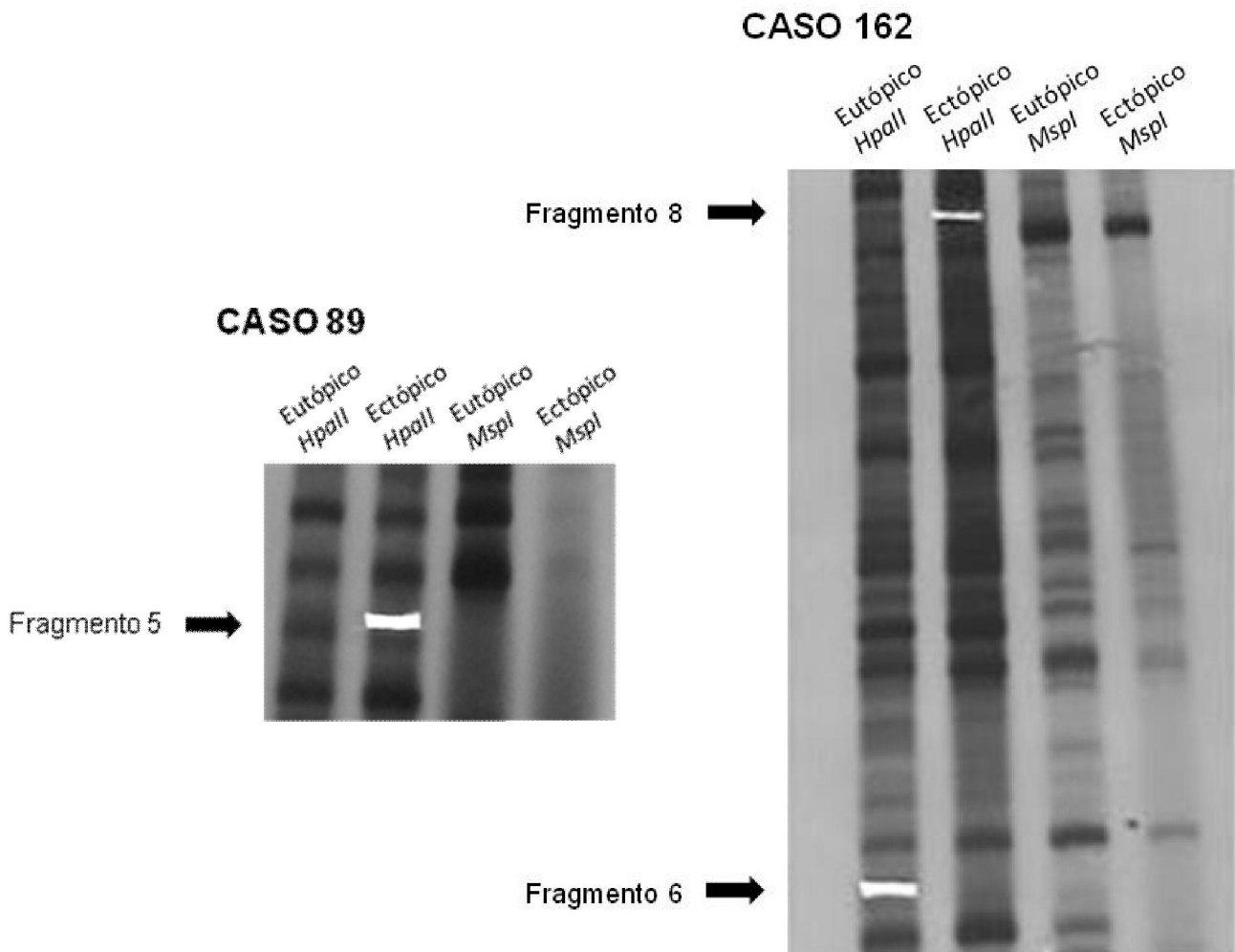


Figura 7. Interface gráfica do *software Agilent Technologies Genomic Workbench (DNA Analytics 5.0) (Agilent Technologies)* ilustrando as sondas hibridadas na região do gene *HOXD9*.



## B) IDENTIFICAÇÃO DOS PERFIS DIFERENCIAIS DE METILAÇÃO DO DNA NA ENDOMETRIOSE BASEADA NA ESTRATÉGIA DE MS-AP-PCR (*METHYLATION-SENSITIVE ARBITRARILY PRIMED POLYMERASE CHAIN REACTION*)

Nos dois pares de amostras avaliados foram detectadas diferenças na metilação de dinucleotídeos CpG localizados em sítios *HpaII*. No conjunto, um total de nove fragmentos diferencialmente metilados foram identificados: cinco bandas provavelmente contendo sítios CCGG hipometilados e quatro com prováveis sítios CCGG hipermetilados. Destas, três foram recuperadas, clonadas e sequenciadas com sucesso (Figura 8).



**Figura 8.** Análise de MS-AP-PCR a partir do DNA proveniente das amostras de endométrio eutópico e da endometriose (caso 89 e 162) digerido com as enzimas de restrição *HpaII* e *MspI*. Observa-se a posição de três bandas com provável metilação diferencial e que foram cortadas do gel, recuperadas e sequenciadas. Os fragmentos 5 e 8 representam bandas mostrando sítios CCGG metilados na endometriose. A ausência de amplificação da banda correspondente ao fragmento 6 a partir do DNA da endometriose indica a perda de metilação nestes sítios.

Após análise dos eletroferogramas obtidos pelo *software phredPhrap*, as sequências consenso geradas foram introduzidas na ferramenta BLAT para a obtenção de dados de mapeamento e identidade com genes específicos. Os fragmentos sequenciados corresponderam ao gene *COL6A2* (*collagen, type VI, alpha2*) mapeado em 21q22.3, *GPX3* (*glutathione peroxidase 3*) em 5q23 e *NXN* (*nucleoredoxin*) em 17p13.3. Nos dois últimos genes, os fragmentos mapearam em regiões intrônicas, sendo o do gene *NXN* provavelmente hipometilado na endometriose e o do gene *GPX3* hipermetilado nesta doença (Figura 9). O fragmento correlacionado ao gene *COL6A2* (provavelmente hipermetilado) mostrou identidade com a região promotora desse gene, muito próximo a uma ilha CpG (Figura 10). Estes fragmentos apresentam elevado conteúdo de CG, como pode ser observado na Figura 11.

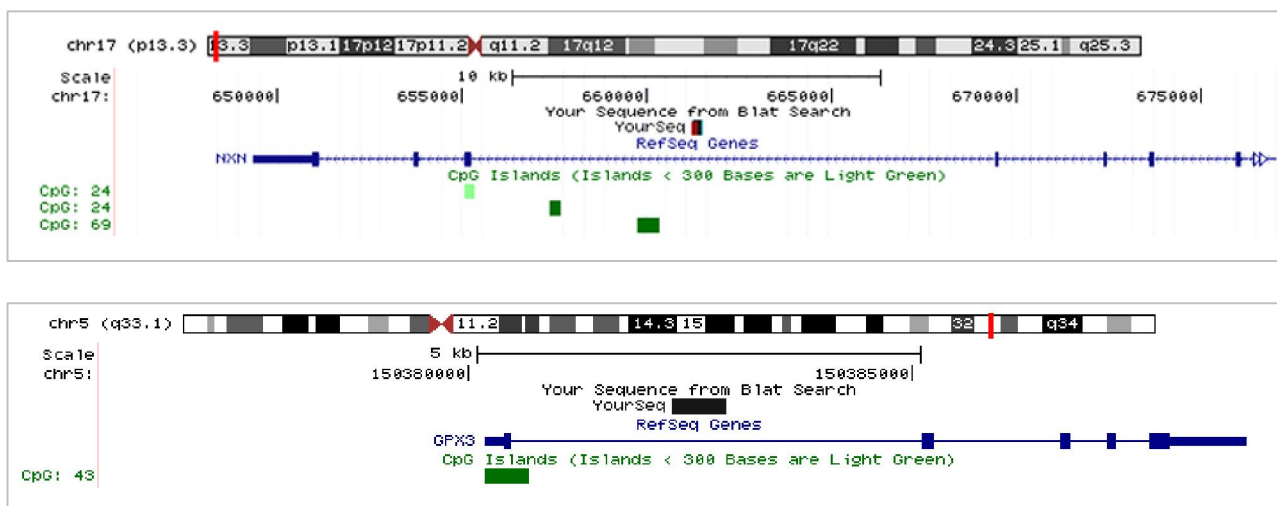


Figura 9. A sequência consenso de dois fragmentos obtida pelo *software phredPhrap* foi alinhada no genoma humano pelo uso da ferramenta BLAT. Um dos fragmentos (tag de 314pb) mostrou identidade com uma região intrônica do gene *NXN* (*nucleoredoxin*). A sequência do outro fragmento (tag de 597pb) mostrou identidade com uma região intrônica do gene *GPX3* (*glutathione peroxidase 3*) [*Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway, assembly: Feb.2009* (GRCh37/hg19), disponível em <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, acesso em julho/2009].



Figura 10. A sequência consenso obtida pelo *software phredPhrap* foi alinhada no genoma humano pelo uso da ferramenta BLAT. A sequência do fragmento (tag de 262pb) mostrou identidade com a região promotora do gene *COL6A2* (*collagen, type VI, alpha2*), muito próximo a uma ilha CpG (CpG150) [*Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway, assembly: Feb.2009* (GRCh37/hg19), disponível em <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, acesso em julho/2009].

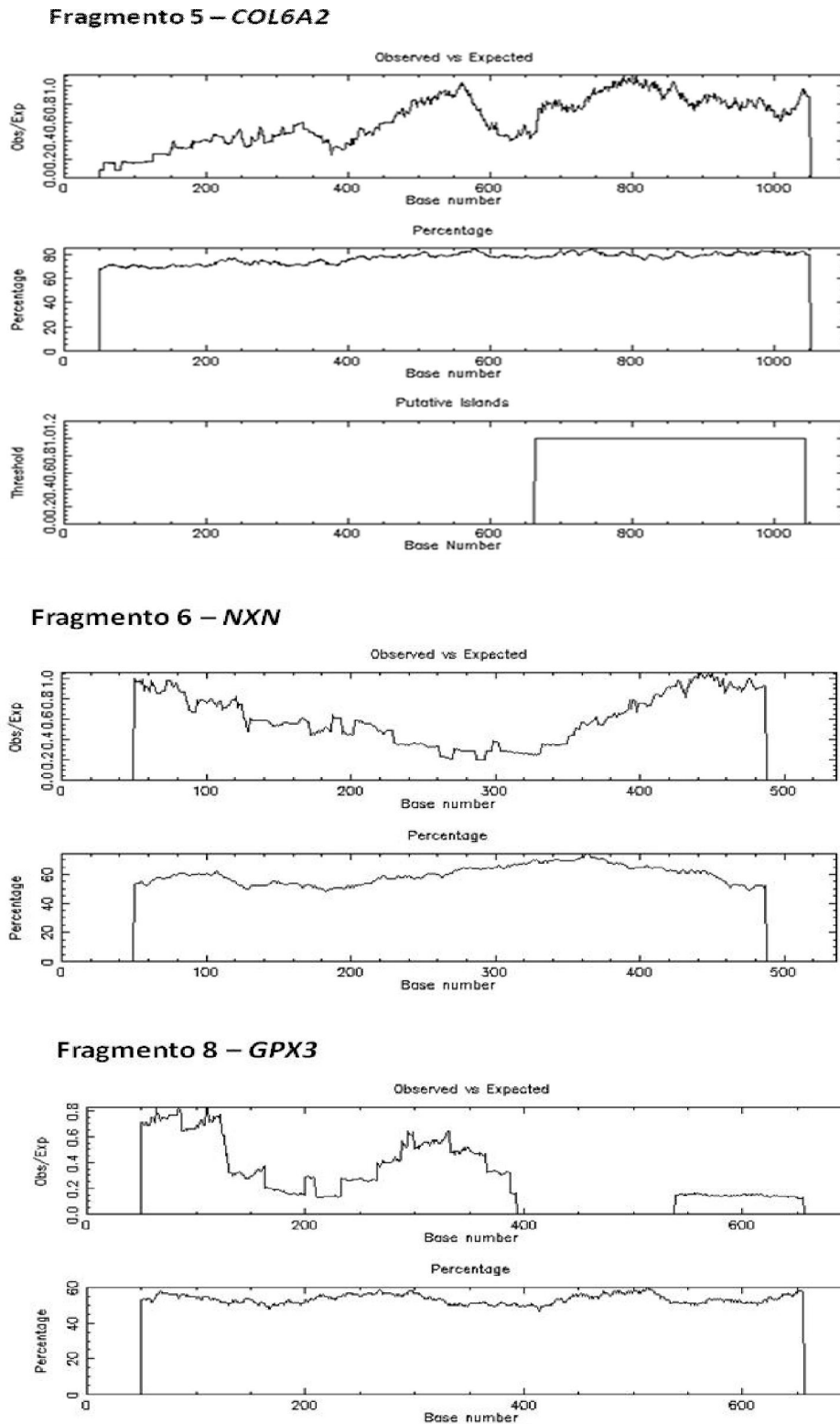


Figura 11. Conteúdo de CG dos três fragmentos correspondentes aos genes *COL6A2*, *NXN* e *GPX3*, respectivamente, de acordo com ferramenta *CpG Plot* (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html>). O fragmento correspondente ao gene *COL6A2* contém elevado conteúdo de CG (>60%), porém está mapeado anteriormente à ilha CpG predita.

Entre os três genes identificados nesta abordagem, o gene *COL6A2* foi selecionado para uma etapa de confirmação do seu padrão de metilação diferencial pelo sequenciamento do DNA modificado pelo bissulfito de sódio.

Para a padronização da reação de PCR, várias abordagens foram testadas para a obtenção do melhor procedimento em amostras de DNA provenientes de sangue periférico e de linhagens celulares, para se evitar a perda de DNA das amostras de endometriose que possuem quantidades limitadas, porém até o momento não foi obtido sucesso.

# Discussão

O delineamento deste trabalho foi motivado por dois achados laboratoriais casuais em estudos prévios do nosso grupo. O primeiro refere-se a uma amostra de adenomiose que foi coletada entre 54 amostras de tecido uterino para o estudo do padrão de regulação do *imprinting* genômico dos genes *IGF2* e *H19* em tumores humanos (Rainho et al., 1999). Esta amostra era proveniente de uma paciente de 46 anos de idade e apresentava expressão bialélica do gene *IGF2*, um evento relacionado posteriormente a padrões alterados de metilação na DMR (*Differentially Methylated Region*) no centro regulador do *imprinting* dos genes *IGF2* e *H19* (Cui, 2007). A adenomiose caracteriza-se pela presença de glândulas e estroma endometrial no miométrio, associada frequentemente a leiomiomas ou endometriose (Wood, 2001). O segundo achado refere-se a uma amostra de endometriose coletada entre 74 amostras de carcinomas de bexiga utilizados num segundo estudo (Negraes et al., 2008) que avaliou o padrão de metilação dos genes *RARB* (*retinoic acid receptor, beta*), *RASSF1* [*Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1*], *CDH1* (*Epithelial cadherin*) e *SFN* (*stratifin* ou 14-3-3 sigma) em carcinomas de células transicionais de bexiga. Esta amostra era proveniente de uma paciente de 33 anos e mostrou a hipermetilação em três genes: *CDH1*, *RASSF1* e *SFN*. Os dois casos tiveram diagnóstico histopatológico confirmado.

Nos últimos oito anos, surgiram evidências de que a endometriose pode ser considerada uma doença epigenética. Wu et al. (2007c) identificaram a expressão aumentada das DNMT1, 3A e 3B na endometriose e desde o estudo pioneiro de Martini et al. (2002), que relataram padrões anormais da metilação do DNA em genes específicos na endometriose, alguns estudos associaram as alterações epigenéticas aos padrões diferenciais de expressão gênica entre endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose (Tabela 1). Estes,



entretanto, foram baseados numa abordagem do tipo gene candidato e um número reduzido de genes foi efetivamente investigado. Dessa forma, este estudo propôs a identificação de perfis diferenciais da metilação do DNA na endometriose pelo emprego de abordagens em larga escala baseadas em *microarrays* e MS-AP-PCR. Para a análise em *microarrays* foram realizados dois experimentos baseados em hibridações de frações metiladas e não metiladas provenientes de amostras de endométrio eutópico e ectópico de pacientes com endometriose, em uma plataforma contendo 27.800 ilhas CpG.

As plataformas de ilhas CpG são ferramentas poderosas que permitem a avaliação da metilação em milhares de ilhas CpG simultaneamente. O uso dessa tecnologia é direcionado à geração de dois tipos de dados: agrupamento de genes para a descoberta de perfis comuns pelas análises de *clustering* ou filtragem para a identificação de padrões incomuns resultando na seleção de genes específicos de interesse (Wu 2001), sendo este último o foco do presente estudo.

A caracterização molecular de células e tecidos alterados tem revolucionado a pesquisa e o diagnóstico de diversas doenças humanas. Entretanto, a heterogeneidade inerente aos tecidos primários anormais, devido à coexistência de várias populações celulares, pode interferir no resultado e na interpretação dos dados obtidos por diferentes tipos de análises. Nos últimos anos, a microdissecção de cortes histológicos ou de preparações citológicas tem sido frequentemente utilizada como uma alternativa para se contornar os obstáculos impostos pela complexidade dos tecidos como a endometriose, e para a obtenção de populações homogêneas de células identificadas morfológicamente. Associada às técnicas de biologia molecular cada vez mais sensíveis (como a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real -qPCR- e a análise baseada na hibridação em

*microarrays*), a microdissecção tornou-se uma ferramenta indispensável na pesquisa em patologia. A microdissecção a *laser* (LCM) é uma técnica desenvolvida para o isolamento de populações celulares puras ou de células únicas a partir de cortes histológicos ou de preparações citológicas heterogêneas pela visualização direta das células. A técnica é bastante versátil, permitindo a análise de DNA, RNA, ou proteínas extraídos por várias abordagens metodológicas que detenham sensibilidade suficiente para a obtenção destas moléculas a partir de amostras em quantidades limitadas (Espina et al., 2006; Frost et al., 2001).

Desta forma, para a maioria dos protocolos experimentais, a inclusão de uma etapa prévia que permita ao pesquisador distinguir e isolar as células alvo do estudo das células/tecidos adjacentes indesejados, sem dúvida agregará valor à informação obtida. No presente estudo, para o processamento da amostra de DNA genômico (digestão enzimática) e posterior hibridação na plataforma *Human CpG Island Chip-on-Chip 244K* houve a necessidade da obtenção de amostras de DNA genômico de alta qualidade e em grande quantidade. Dessa forma, utilizou-se um procedimento de microdissecção manual adaptada da estratégia de Pires et al. (2006) para a construção de TMA (*Tissue Microarray*). Esta adaptação representa uma alternativa à LCM, pois a quantidade mínima de DNA recuperada após este procedimento foi um fator limitante no presente trabalho.

Após a etapa de microdissecção manual foi possível a obtenção de amostras consideradas como puras (casos 190 e 207), contendo apenas células endometrióticas; porém outras amostras continham células endometrióticas juntamente com tecido intestinal adjacente residual (casos 116, 169, 192, 199, 214, 255 e 256). Deve-se ressaltar que todas as amostras microdissecadas apresentaram, no máximo, 20% de células intestinais contaminantes. Essa

contaminação, entretanto, não interferiu significativamente nos resultados obtidos, uma vez que as amostras consideradas como puras não apresentaram uma quantidade maior de genes encontrados como diferencialmente metilados em comparação com as demais.

Para as etapas subsequentes foram escolhidas as amostras que geraram quantidades de DNA suficientes para as digestões com as enzimas de restrição já que algumas geraram quantidades menores de DNA devido às áreas restritas de lesão endometriótica no tecido intestinal.

Embora a endometriose não seja um processo neoplásico e possa ser distinguida do câncer por não ocasionar distúrbios catabólicos, consequências metabólicas ou morte, alguns processos celulares são comuns nestas condições incluindo motilidade celular, adesão, invasão, presença de fatores imunológicos, manutenção da estrutura e arquitetura original nos sítios ectópicos, angiogênese e metaplasia. Além disso, há evidências de que as lesões endometrióticas apresentem alterações genéticas similares às identificadas no câncer (Thomas e Campbell, 2000; Nezhat et al., 2008). Dessa forma, muitos genes estudados no câncer poderiam também estar envolvidos na endometriose.

Quanto aos genes identificados como hipermetilados neste estudo, 19 são representativos da região promotora. Vários são descritos na literatura como regulados epigeneticamente como *BMP4*, *MAD1L1*, *PAX6*, *FOXC1*, *MSX1*, *VPS52*, *PRDM16*, *DLX2*, *LBX1*, *PTPRN2*, *HOXD8* e *HOXB13* enquanto outros, como *MAD1L1*, *WDR5*, *GFI1*, *BCOR* e *DEK*, são capazes de modificar a estrutura da cromatina de genes alvos. O gene *KCNQ1* é regulado por *imprinting*. Destes, os genes *MAD1L1*, *PAX6*, *FOXC1*, *MSX1*, *EMX2*, *HOXD8* e *HOXB13* são considerados supressores tumorais. Alguns são fatores de transcrição, com destaque para os

genes *Homeobox* como *PAX6*, *FOXC1*, *PRDM16*, *MSX1*, *EMX2*, *DLX2*, *LBX1*, *HOXD8* e *HOXB13*. Outros participam de processos envolvidos com a regulação da apoptose e/ou do ciclo celular como *FOXC1*, *MSX1*, *BMP4*, *GF11* e *MAD1L1*. Desses, apenas o gene *EMX2*, é descrito como alterado na endometriose (Daftary e Taylor, 2004). Todos estes genes são interessantes para as próximas etapas deste estudo e conseqüentemente, para a definição de novos biomarcadores para a endometriose.

O transcrito do gene *MAD1L1* [*mitotic arrest deficiency like-1 (yeast)*] mapeado em 7p22 codifica uma proteína antagonista celular de MYC, pois pode induzir a condensação da cromatina para uma estrutura fechada, bem como atuar como *checkpoint* do ciclo celular. Acredita-se que a proteína oncogênica MYC recrute HATs (acetilases de histonas) e ative seus alvos enquanto MAD1 reprime os genes alvos de MYC por recrutar HDACs (desacetilases de histonas) aos promotores correspondentes (Ge et al., 2010), sendo considerada uma proteína supressora tumoral. Este gene foi relatado como regulado epigeneticamente em amostras de linfoma folicular (Bennett et al., 2009).

O transcrito do gene *WDR5* (*WD repeat domain 5*) mapeado em 9q34 compõe um complexo de metiltransferases de histonas juntamente com a proteína MLL1, que é homóloga da proteína *Trithorax*(TRX) de *Drosophila*. A proteína WDR5 se liga seletivamente à lisina 4 da histona H3 (H3K4) para promover trimetilação de K4 por MLL (Nakamura et al., 2002; Wysocka et al., 2005). Sabe-se que a di- e trimetilação da H3K4 estão associadas com a região codificante de genes ativamente transcritos (para revisão Kouzarides, 2007). Dou et al. (2006) determinaram que a ausência de WDR5 abole completamente a atividade de metilação deste complexo em genes dependentes de MYC e da família *HOX*(Hyllus

et al., 2007), principalmente *HOXA9* e *HOXC8* bem caracterizados como alvos desse complexo (Crawford e Hess, 2006).

O transcrito do gene *GFI1* (*growth factor independence 1 transcription repressor*) mapeado em 1p22 é necessário na hematopoiese sendo descrito como um dos reguladores intrínsecos das células-tronco hematopoiéticas (Hock et al., 2004). Estudos demonstraram que essa proteína participa em eventos celulares distintos como proliferação, apoptose, diferenciação, determinação de morte celular e tumorigênese (Jafar-Nejad e Bellen, 2004) pela regulação de genes que codificam citocinas e oncogenes, como *MYC* (Zweidler-McKay et al., 1996). Além disso, GFI1 é relatada regulando o desenvolvimento do SNC, das células neuroendócrinas do pulmão e das células epiteliais intestinais (Wallis et al., 2003; Kazanjian et al., 2004; Shroyer et al., 2005). É considerada uma repressora transcricional e age pelo recrutamento de complexos contendo desacetilases de histonas (McGhee et al., 2003) como foi observado para o gene *CDKN1A* [*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)*] (Duan et al., 2005), um gene importante para a regulação da progressão do ciclo celular.

O transcrito do gene *BCOR* (*BCL6 co-repressor*) mapeado em Xp21.2-p11.4 é um co-repressor essencial em múltiplas etapas do desenvolvimento e necessário durante a hematopoiese normal (Gearhart et al., 2006). Este gene é relatado mediando repressão transcricional através de modificações epigenéticas envolvendo desacetilases e metilases de histonas (Huynh et al., 2000). Seu alvo, o gene *BCL6*, é um repressor transcricional primeiramente identificado como proto-oncogene frequentemente expresso em linfoma não-Hodgkin e exerce grande importância durante a diferenciação de linfócitos (Pasqualucci et al., 2003).

A proteína codificada pelo gene *DEK* (*DEK oncogene*) mapeado em 6p22.3 é estritamente nuclear ocorrendo na grande maioria associada ao DNA e está envolvida na regulação transcricional, pelo remodelamento da cromatina ou alterando a eficiência com a qual os fatores de transcrição se ligam ao DNA (Waldmann et al., 2004). Além disso, esse gene é considerado como um oncogene descrito como expresso em altos níveis em carcinoma hepatocelular (Kondoh et al., 1999), melanoma (Grottke et al., 2000; Carro et al., 2006), câncer de cólon, laringe, bexiga (Carro et al., 2006), carcinoma cervical uterino (Wu et al., 2008) e adenocarcinoma ovariano (Han et al., 2009) sendo sua expressão correlacionada com a proliferação celular (Waldmann et al., 2004). Wise-Draper et al. (2006) propuseram um modelo no qual os altos níveis de expressão de DEK estimularia a carcinogênese humana pela inibição das vias supressoras tumorais dirigidas por p53.

O gene *PAX6* (*paired box 6*) mapeado em 11p13, um supressor tumoral, é descrito como hipermetilado em linfoma folicular (Bennett et al., 2009), carcinoma duodenal relacionado à polipose adenomatosa familiar (Berkhout et al., 2007), câncer de próstata (Mishra et al., 2010) e câncer de bexiga (e mucosa normal adjacente) e está associado com progressão do câncer (Hellwinkel et al., 2008). Este gene codifica um fator de transcrição altamente conservado envolvido na embriogênese. Além disso, está relacionado com a determinação de morte celular em células pancreáticas e intestinais, desenvolvimento dos olhos e cérebro (Berkhout et al., 2007) e é necessário para a função endócrina normal do pâncreas (Salem et al., 2000). O gene *PAX6* também é descrito contendo modificações nas histonas como acetilação H3K9 e trimetilação de H3K4 compatíveis com ativação

transcricional em linhagens de teratocarcinoma humano indiferenciado (Dahl e Collas, 2007).

O gene *FOXC1* (*forkhead box C1*) mapeado em 6p25 é membro de uma família de fatores de transcrição necessários para a manutenção do estado celular diferenciado, expressão gênica tecido-específica, embriogênese e tumorigênese (Kaufmann e Knöchel, 1996). É encontrado hipometilado e altamente expresso em células progenitoras de mama e especula-se ser importante na diferenciação das células epiteliais mamárias. É considerado um supressor tumoral e sua hipermetilação foi relatada em metástases distantes de câncer de mama comparadas ao tumor primário, evidenciando um papel diferencial das células metiladas na progressão da doença (Bloushtain-Qimron et al., 2008). Além disso, a inativação do *FOXC1* tem papel no desenvolvimento de câncer ovariano e endometrial (Zhou et al., 2002).

O gene *PRDM16* (*PR domain containing 16*, também chamado de *MEL1*) mapeado em 1p36.23-p33 é membro de uma família de fatores de transcrição. Este gene é descrito como envolvido na imortalização de células hematopoiéticas que normalmente teriam auto-renovação limitada (Du et al., 2005) e é epigeneticamente regulado sendo hipermetilado em leucemia de células-T adulta (Yoshida et al., 2004).

O gene *MSX1* (*msh homeobox 1*) mapeado em 4p16.3-p16.1 é um membro de uma família de genes *homeobox*, considerado como supressor tumoral. A proteína correspondente foi identificada como reguladora da proteína p53 pela estabilização e restauração da função apoptótica desta proteína. Assim, acredita-se que a mesma induziria a apoptose de células cancerosas e, conseqüentemente, supressão do crescimento de tumores humanos (Park et al, 2005). A expressão

desse gene foi identificada como diminuída em câncer cervical (Shim et al., 1998) e sua metilação foi demonstrada em vários tumores epiteliais como de mama, pulmão, próstata, cólon (Shames et al., 2006) e gástrico (Yamashita et al., 2006).

O gene *EMX2* (*empty spiracles homeobox 2*) mapeado em 10q26.1 é essencial para o desenvolvimento do telencéfalo (Yoshida et al., 1997) e do trato reprodutivo, sendo altamente expresso em células epiteliais do sistema urogenital (Miyamoto et al., 1997). É regulado negativamente em tecidos reprodutivos por outro gene *homeobox*, o gene *HOXA10*, que age como um fator de transcrição (Troy et al., 2003). Acredita-se também que o produto do gene *EMX2* exerça efeitos antiproliferativos no epitélio endometrial (Noonan et al., 2001) sendo considerado um supressor tumoral. Daftary e Taylor (2004) demonstraram que este gene encontra-se altamente expresso em endométrio de pacientes com e sem endometriose. Achado semelhante também foi obtido por Kim et al. (2007) que identificaram altos níveis de expressão deste gene em endométrio eutópico de babuínos com endometriose induzida experimentalmente comparado ao endométrio de babuínos sem endometriose. Noonan et al. (2001) observaram baixos níveis de expressão deste gene em linhagens celulares e tumores endometriais primários e sugeriram que a metilação do DNA pode ser um mecanismo de inativação transcricional do gene.

O gene *DLX2* (*distal-less homeobox 2*) mapeado em 2q32, próximo ao *cluster HOXD*, é um membro de uma família de fatores de transcrição *homeobox*, importante durante a diferenciação neuronal (McGuinness et al., 1996). Este gene é descrito como regulado epigeneticamente sendo encontrado altamente metilado em astrocitomas (Wu et al., 2010).

O gene *LBX1* (*ladybird homeobox 1*) mapeado em 10q24 é um fator de transcrição *homeobox* relacionado com miogênese e neurogênese relatado como



hipermetilado em câncer de pulmão (Rauch et al., 2006) e expresso em altos níveis em câncer de mama (Yu et al., 2009).

Os genes *HOXD8* (*homeobox D8*) mapeado em 2q31.1 e *HOXB13* (*homeobox B13*) mapeado em 17q21.2 são membros da família altamente conservada de fatores de transcrição *HOX*, que regulam o desenvolvimento embrionário e são necessários para a manutenção da homeostasia celular em células adultas (Lewis, 2000). O gene *HOXD8* é importante na maturação e manutenção dos vasos linfáticos (Harada et al., 2009). É considerado um supressor tumoral relatado como hipermetilado e, conseqüentemente não expresso, em linfoma de células do manto (Leshchenko et al., 2010). O gene *HOXB13* tem propriedade de supressor tumoral sendo sua expressão regulada pelo estrógeno (Wang et al., 2007). É inativado por hipermetilação da sua região promotora em melanomas (Muthusamy et al., 2006), carcinomas de células renais (Okuda et al., 2006), câncer de mama ER-positivo (Rodriguez et al., 2008) e expresso em baixos níveis em cânceres de próstata (Jung et al., 2004) e colorretal (Jung et al., 2005), onde exerce papel antiproliferativo. Ghoshal et al. (2010) identificaram que a ilha CpG contida na região promotora desse gene está não metilada em cólon normal e em células de câncer de cólon mas uma região a aproximadamente 4,5kb *upstream* ao sítio de início da transcrição é alvo da ação da DNMT3B e que a metilação dessa região está envolvida na modulação da expressão desse gene. Além destes, deve-se ressaltar que o gene *HOXD9* (*homeobox 9*), também mapeado em 2q31.1, foi detectado como hipermetilado em quatro casos de endometriose no presente estudo. Entretanto, este gene nunca foi relatado como associado a padrões epigenéticos anormais em células humanas.

O transcrito do gene *BMP4* (*bone morphogenetic protein 4*) mapeado em 14q22-q23 inibe a miogênese, tem papel chave na indução dos precursores de células endoteliais (angioblastos) (Banerjee e Bacanamwo, 2010) e está envolvido no desenvolvimento cerebral e diferenciação neuronal (Wu et al., 2010). Além disso, altos níveis de expressão deste gene foram relatados em alguns tumores primários como rabiomiossarcomas primários, e relacionados com a agressividade e metástase tumorais vistos em outros sarcomas (Goldstein et al., 2007). Banerjee e Bacanamwo (2010) demonstraram que a expressão deste gene foi fortemente estimulada pela inibição das DNMTs durante a diferenciação das células-tronco embrionárias em células endoteliais e Wu et al. (2010) relataram que esse gene foi frequentemente metilado em astrocitomas.

O gene *VPS52* [(*vacuolar protein sorting 52 homolog (S. cerevisiae)*)] mapeado em 6p21.3 codifica uma proteína constituinte de um complexo envolvido no sistema de transporte retrógrado associado ao Golgi. Embora existam poucos relatos na literatura, este gene pode ser regulado epigeneticamente conforme demonstrado por Yaoi et al. (2008) ao observar uma extensa desmetilação *de novo* nas ilhas CpG associadas a este gene em fetos de camundongos após exposição materna ao bisfenol.

O gene *PTPRN2* (*protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2*) mapeado em 7q36 codifica um membro de uma família de proteínas tirosina fosfatase (PTP) conhecidas como moléculas de sinalização que regulam uma variedade de processos celulares incluindo crescimento celular, diferenciação, ciclo mitótico e transformação oncogênica (Alonso et al., 2004). Este gene foi descrito como altamente metilado em câncer de pulmão (Anglim et al., 2008).

O locus *KCNQ1* (potassium voltage-gated channel, *KQT-like subfamily, member 1*) mapeado em 11p15.5 pertence a um grupo de genes controlados por *imprinting* no qual o alelo paterno codifica um longo RNA não transcrito (*kcnq1ot1*, ou *LIT1*) e, no mínimo, oito variantes codificadoras de proteína expressas maternamente (Lee et al., 1999). A região cromossômica 11p15 contém ao menos oito genes regulados por *imprinting* (Morison e Reeve, 1998) sendo o *KCNQ1* localizado entre os genes *IGF2/H19* e *CDKN1C* (Lee et al., 1997). Este domínio foi associado com a Síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS), tumor de Wilms e rabdomyosarcoma (Xia et al., 2002). A região diferencialmente metilada (DMR) deste gene é relatada como responsável por um mecanismo conhecido como silenciamento de longo alcance (*long-range silencing*) (Thakur et al., 2003). Thakur et al. (2004) sugeriram que a transcrição de *kcnq1ot1* resulta no recrutamento de fatores de silenciamento associados com desacetilases e metiltransferases de histonas, culminando com a modificação da cromatina em *cis* que não ocorre no cromossomo materno (Mancini-DiNardo et al., 2006). Lee et al. (1997) sugeriram que o locus *KCNQ1* pode agir como um centro de controle de *imprinting* de 11p15. Assim, a perda da regulação deste gene poderia alterar o *imprinting* de outros genes no cromossomo materno como o silenciamento epigenético de *CDKN1C* e expressão bialélica de *IGF2*. Dessa forma, o gene *KCNQ1* mostra-se um candidato interessante para a validação posterior e pode explicar um dos primeiros achados obtidos no laboratório em uma amostra de adenomiose e que foi uma das motivações para o delineamento deste estudo.

Embora não ocorram registros na literatura envolvendo modificações epigenéticas para os demais genes identificados neste trabalho, os mesmos são também interessantes e podem se tornar novos marcadores candidatos da

endometriose principalmente para os genes cuja metilação foi identificada nas sondas localizadas na região promotora como *PCGF1* (*polycomb group ring finger 1*), *FOXQ1* (*forkhead box Q1*), *PLEC* (*plectin*), *CSPP1* (*centrosome and spindle pole associated protein 1*), *CSGALNACT2* (*chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2*), *DRGX* (*dorsal root ganglia homeobox*), *C11orf1* (*chromosome 11 open reading frame 1*), *EFNA2* (*ephrin-A2*), *TNRC18* (*trinucleotide repeat containing 18*) e *ZNF295* (*zinc finger protein 295*) (ANEXOS VII e VIII).

O gene *RBM35A* (*RNA binding motif protein 35A*) ou *ESRP1* (*epithelial splicing regulatory protein 1*), provavelmente hipermetilado na endometriose (em sondas presentes no interior do gene), não é descrito na literatura como regulado epigeneticamente, mas também deve ser melhor investigado porque este gene foi recentemente descrito como supressor tumoral em câncer colorretal. É encontrado mutado em aproximadamente 50% das amostras de carcinoma de cólon e foi observado que sua proteína era capaz de suprimir o potencial maligno das células cancerosas após a reintrodução deste gene (Leontieva e Ionov, 2009).

Além dos genes descritos, também se deve ressaltar o achado da metilação em vários genes compreendidos no *cluster HOXA* mapeado no cromossomo 7, uma região bastante estudada na literatura e cuja metilação é vista comumente em cânceres. Os genes *HOXA* são essenciais para a diferenciação dos ductos müllerianos em tubas uterinas, útero e cervix e para o funcionamento normal dessas estruturas no adulto (Massé et al., 2009).

A metilação do gene *HOXA4* (*homeobox A4*), *HOXA5* (*homeobox A5*) e *HOXA6* (*homeobox A6*) foi relatada em leucemias (Strathdee et al., 2009). Raman et al. (2000) identificaram que *HOXA5* é um regulador positivo da transcrição de *TP53* exercendo a função de supressor tumoral e que a expressão desse gene é reduzida

decorrente da metilação de sua região promotora em câncer de mama p53 negativo. A metilação deste gene também foi identificada em câncer de pulmão (Kim et al., 2009). A metilação do gene *HOXA7* (*homeobox A7*) foi descrita em câncer de pulmão (Rauch et al., 2007) e sua expressão aumentada, em câncer ovariano (Yamashita et al., 2006; Ota et al., 2007). Altos níveis de expressão do gene *HOXA13* (*homeobox A13*) foram descritos em leucemias (Su et al., 2006), câncer ovariano (Yamashita et al., 2006) e carcinoma de esôfago (Gu et al., 2009).

Um achado adicional importante e que deve ser destacado é a metilação significativa ( $\log \text{ratio}=3.425.902$  e  $p=3,80E-03$ ) observada em uma sonda localizada na região promotora do gene DNMT3A em um dos casos avaliados (190). Essa DNMT é descrita como metiltransferase *de novo* (Espada e Esteller, 2010).

A quantidade relativamente pequena de genes encontrados como diferencialmente metilados pode ser explicada pelo fato do presente estudo ter sido baseado na co-hibridação de DNA eutópico e ectópico provenientes da mesma paciente. Vários estudos (Sharpe-Timms, 2001; Absenger et al., 2004) descreveram que endométrio eutópico de mulheres com endometriose apresenta alterações em comparação ao endométrio de mulheres livres da doença sugerindo que o endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose compartilham alterações que não são encontradas no endométrio de mulheres sem a doença (Sharpe-Timms, 2001). Isto pode ainda ser corroborado pela hipótese de que uma predisposição genética ou exposição a agentes ambientais das células progenitoras fetais destinadas a formar os órgãos pélvicos femininos adultos poderia resultar em eventos epigenéticos como hipo ou hipermetilação de regiões promotoras de genes específicos, culminando com o aparecimento de um fenótipo endometriótico e predispondo ao desenvolvimento da doença na vida adulta. Dessa forma, os

achados do presente estudo indicam a aquisição de alterações epigenéticas necessárias ao desenvolvimento ou progressão da endometriose, enquanto análises do endométrio eutópico de pacientes com endometriose em comparação ao endométrio de mulheres sem a doença, poderiam indicar perfis epigenéticos associados com a predisposição à doença.

Somando-se a isso, os parâmetros empregados para a filtragem dos dados foram altamente restritivos. Estécio et al. (2007), ao analisar o perfil de metilação em amostras de câncer colorretal, empregou *log ratio* 1,3 (enriquecimento de genes 2,6X metilados diferencialmente) para a filtragem de seus dados, entretanto, ao alterar esses parâmetros para condições mais permissivas o número de genes identificados seria aumentado mas a especificidade da metilação diferencial dos mesmos não seria garantida. Dessa forma, os dados relatados no presente estudo sugerem que os genes identificados são bons candidatos a genes mostrando padrões anormais de metilação do DNA na endometriose.

Além disso, a quantidade relativamente baixa de genes identificados, em especial após o enriquecimento da fração não metilada, pode ser explicada pelo próprio sítio atípico de reconhecimento da enzima de restrição empregada, *McrBC*, uma condição na qual apenas segmentos de DNA mostrando alta densidade de metilação seriam passíveis de digestão. Além disso, os genes obtidos como significantes são aqueles apresentando provável hipometilação na endometriose (*log ratio* 2,0), e acredita-se que citosinas não metiladas são menos abundantes no genoma do que as citosinas metiladas (dependendo do tecido 70%-90% das citosinas estão metiladas). Assim essas análises da fração não metilada do genoma se tornam mais sensíveis na detecção de alterações exuberantes (Schumacher et al., 2006). A grande especificidade dos sítios *McrBc* (Irizarry et al. 2008) os torna

altamente informativos, como pode ser observado na Tabela 11, na qual a avaliação do número de sondas por gene mostrando dados concordantes foi maior em relação à outra fração. Dessa forma, as informações obtidas provenientes desta fração são altamente específicas. Baseado nisto e no alto custo das lâminas, as amostras das linhagens HCT116 e DKO foram enriquecidas somente com fragmentos não metilados para a análise de *dye swap*.

Adicionalmente, pode ser sugerido que os dois experimentos são capazes de identificar sequências hiper e hipometiladas na endometriose. Em experimentos utilizando apenas a enzima *HpaII* é possível interrogar  $10^4$ - $10^6$  sítios CpG (Irizarry et al., 2008) dispersos pelo genoma sendo que no nosso experimento esta enzima foi combinada com outras três aumentando, dessa forma, a resolução da análise. Em experimentos com a enzima *McrBC* isolada, é possível a interrogação de  $>10^6$  sítios CpG (Irizarry et al., 2008). Dessa forma, os experimentos que utilizam a *McrBC*, além de mais informativos, são mais simples pelo emprego de apenas uma enzima de restrição.

Em adição aos novos genes diferencialmente metilados na endometriose detectados no presente estudo também foram avaliados os dados quanto aos genes descritos previamente na literatura como diferencialmente metilados (Tabela1) nesta condição. A maioria destes genes está associada com a via relacionada à produção e liberação do estrógeno nas células endometriais. Entre estes, podemos citar os genes *NR5A1 (SF1)* e *ESR2*, bem estabelecidos como não metilados na endometriose ao contrário das células endometriais. SF1 é o fator de transcrição chave que media a expressão de genes esteroideogênicos culminando com a produção de estradiol nas células endometrióticas. ESR2 suprime os receptores de estrógeno (ESR1) e progesterona (PRs), ocasionando resistência à progesterona

e inativação deficiente do estradiol. Conseqüentemente, o estrógeno é produzido em grandes quantidades no tecido endometriótico facilitando a sobrevivência celular e inflamação (para revisão Bulun, 2009). A hipometilação destes genes foi confirmada em alguns casos no presente estudo, embora os dados não fossem significativos (Tabelas 10 e 11).

Adicionalmente, após a estratégia de MS-AP-PCR, três fragmentos diferencialmente metilados na endometriose foram identificados. Dentre estes, o fragmento correlacionado com o gene *COL6A2* mostra-se muito interessante por ser uma região provavelmente metilada na endometriose e estar contido em uma região com elevado conteúdo de CG e muito próximo a uma ilha CpG na região promotora. Isto é apoiado por achados recentes (Irizarry et al, 2009) que sugerem que regiões diretamente adjacentes a ilhas CpG podem também exibir metilação diferencial.

O gene *COL6A2* (*collagen, type VI, alpha2*) está mapeado em 21q22.3, nas proximidades do gene *COL6A1*, em uma região com elevada densidade gênica. Este gene codifica uma das três cadeias alfa do colágeno tipo VI, uma glicoproteína adesiva da matriz extra-celular encontrada em muitos tecidos conectivos. Estudos bioquímicos indicaram que o colágeno tipo VI promove conexão celular e se liga a proteoglicanos e hialuronidasas. As várias interações biológicas são mediadas através do seu domínio de tripla-hélice assim como pelo domínio não colágeno do tipo VI. Todos estes estudos sugerem que o colágeno VI tem papel significativo na migração e diferenciação celular e que pode ser importante durante o desenvolvimento embrionário (Saitta et al., 1990; Saitta & Chu, 1994). O gene *COL6A2* possui dois promotores distintos controlando sua transcrição (Saitta & Chu, 1994) e três transcritos variantes já foram descritos.



Kopp e colaboradores (1997) demonstraram que a metilação do DNA tem papel importante na inibição da expressão desse gene em linhagens celulares de fibroblastos transformadas pelo vírus símio 40 (SV40). Esse vírus possui um nível altamente elevado de expressão das DNMTs. O seqüenciamento do DNA modificado pelo bissulfato de sódio revelou extensa metilação da região promotora do gene *COL6A2* nas células transformadas por SV40, mas nenhuma metilação na região correspondente em células normais. Essa mesma região contendo uma ilha CpG também foi caracterizada como normalmente não metilada em linfócitos de sangue periférico e placenta por Yamada et al. (2004), pela análise do *status* de metilação alélica das ilhas CpG caracterizadas em 21q.

A análise imunohistoquímica mostrou ausência de expressão do colágeno VI em cistos endometrióticos comparados a lesões de endometriose difusas (Nezhat & Kalir, 2002). Esta informação, associada aos achados do presente estudo sugerem que a hipermetilação da região promotora do gene *COL6A2* poderia levar ao seu silenciamento e à ausência ou diminuição da expressão do colágeno do tipo VI em um subgrupo de lesões endometrióticas. Dessa forma, a metilação da região promotora do gene *COL6A2* pode indicar o envolvimento desse gene no desenvolvimento da endometriose, sendo de extrema importância investigações adicionais.

O gene *NXN* (*nucleoredoxin*) está mapeado em 17p13.3 e contém oito éxons, sendo que entre o primeiro e segundo há um grande *gap* de aproximadamente 150kb e os outros sete estão localizados muito próximos. As regiões regulatórias deste gene, incluindo região promotora, ainda não estão bem caracterizadas. Este gene codifica um membro não totalmente caracterizado da família de proteínas tioredoxina (TRX) e tem sido recentemente associado à

regulação da via *Wnt/ -catenin*, uma via que regula a morte celular e desenvolvimento (Funato & Miki, 2007).

Numerosos relatos mostram que a região 17p13.3 é frequentemente perdida em tumores humanos, incluindo câncer de mama, carcinoma hepatocelular, carcinoma cervical e meduloblastomas. As proteínas constituintes da via *Wnt/ -catenina* também são frequentemente expressas em altos níveis em muitos tipos de tumores humanos sendo que regiões promotoras de muitos genes desta via estão hipermetilados nessa doença (Roman-Gomez et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Yau et al., 2005). Este também pode ser o caso do gene *MXI* como observado por Koinuma et al. (2005) que identificou uma região desse gene como hipermetilada em carcinoma colorretal.

O gene *GPX3* (*glutathione peroxidase 3 (plasma)*) está mapeado em 5q23 e tem a função de detoxificação de espécies reativas de oxigênio e manutenção da integridade genética de células de mamíferos. Este gene é considerado um supressor tumoral após observação de que sua inativação completa correlaciona-se com pior prognóstico em câncer de próstata. Neste estudo, a taxa de metilação de uma região no éxon 1 alcançou 90% indicando que a metilação deste gene também é um evento importante em doenças humanas (Yu et al., 2007).

Diante deste achados, o gene *COL6A2* foi selecionado para novas análises da metilação do DNA em um conjunto independente de amostras de endometriose pela metodologia de sequenciamento por bissulfito de sódio. Este ensaio está em fase de padronização das reações de amplificação.

# Conclusões

Diante dos resultados apresentados e discutidos, concluímos que:

§ A investigação de alterações epigenéticas baseada na triagem genômica de microarranjos de ilhas CpG e MS-AP-PCR demonstraram que ocorre ganhos e perdas de metilação em dinucleotídeos CpG relacionados a genes específicos na endometriose;

§ No geral, detectou-se um maior número de genes hipermetilados do que hipometilados, compatível com os maiores níveis de expressão das DNMTs na endometriose em comparação com o endométrio normal, previamente descritos na literatura;

§ Não foi possível correlacionar o perfil de alterações epigenéticas identificado neste estudo com as características clínicas dos pacientes devido, principalmente, ao pequeno tamanho amostral;

§ Apesar do pequeno tamanho amostral, entretanto, foi possível identificar alterações epigenéticas recorrentes. Após o enriquecimento com a fração metilada, foram identificados 53/843 genes recorrentes em pelo menos duas amostras, 6/53 em pelo menos três amostras e o gene *HOXD9* recorrente em quatro amostras. Entre os genes hipometilados apenas dois foram recorrentes. Dentre estes genes destacam-se os fatores de transcrição (*MSX1*, *EMX2*, *HOXB13*, *HOXD8* e *HOXD9*), remodeladores da cromatina (*MAD1L1*, *WDR5* e *BCOR*) ou envolvidos em processos relacionados à apoptose e regulação do ciclo celular (*BMP4*) e o gene regulado por imprinting *KCNQ1*. Estes genes podem ser considerados candidatos a novos biomarcadores epigenéticos na endometriose.

§ Pela abordagem baseada na estratégia de MS-AP-PCR foi identificado o gene *COL6A2* como provavelmente hipermetilado na endometriose.

# Referências Bibliográficas

- Abrao MS, Neme RM, Carvalho FM, Aldrighi JM, Pinotti JA. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. *Int J Gynaecol Obstet* 82(1):31-40, 2003.
- Absenger Y, Hess-Stumpp H, Kreft B, Krätzschmar J, Haendler B, Schütze N, Regidor PA, Winterhager E. Cyr61, a deregulated gene in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 10(6):399-407, 2004.
- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117(6):699-711, 2004.
- Anglim PP, Galler JS, Koss MN, Hagen JA, Turla S, Campan M, Weisenberger DJ, Laird PW, Siegmund KD, Laird-Offringa IA. Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for squamous cell lung cancer. *Mol Cancer* 7:62, 2008.
- Arimoto T, Katagiri T, Oda K, Tsunoda T, Yasugi T, Osuga Y, Yoshikawa H, Nishii O, Yano T, Taketani Y, Nakamura Y. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis. *Int J Oncol* 22(3):551-60, 2003.
- Banerjee S, Bacanamwo M. DNA methyltransferase inhibition induces mouse embryonic stem cell differentiation into endothelial cells. *Exp Cell Res* 316(2):172-80, 2010.
- Barlow DH, Kennedy S. Endometriosis: new genetic approaches and therapy. *Annu Rev Med* 56:345-56, 2005.
- Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 6(2):107-116, 2006.
- Bennett LB, Schnabel JL, Kelchen JM, Taylor KH, Guo J, Arthur GL, Papageorgio CN, Shi H, Caldwell CW. DNA hypermethylation accompanied by transcriptional repression in follicular lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 48(9):828-41, 2009.
- Berkhout M, Nagtegaal ID, Cornelissen SJ, Dekkers MM, van de Molengraft FJ, Peters WH, Nagengast FM, van Krieken JH, Jeuken JW. Chromosomal and methylation alterations in sporadic and familial adenomatous polyposis-related duodenal carcinomas. *Mod Pathol* 20(12):1253-62, 2007.
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 23;128(4):669-81, 2007.
- Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B, Doucet D, Thomas NJ, Wang Y, Vollmer E, Goldmann T, Seifart C, Jiang W, Barker DL, Chee MS, Floros J, Fan JB. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res* 16(3):383-93, 2006.
- Bloushtain-Qimron N, Yao J, Snyder EL, Shipitsin M, Campbell LL, Mani SA, Hu M, Chen H, Ustyansky V, Antosiewicz JE, Argani P, Halushka MK, Thomson JA, Pharoah P, Porgador A, Sukumar S, Parsons R, Richardson AL, Stampfer MR, Gelman RS,

- Nikolskaya T, Nikolsky Y, Polyak K. Cell type-specific DNA methylation patterns in the human breast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(37):14076-81, 2008.
- Borghese B, Mondon F, Noël JC, Fayt I, Mignot TM, Vaiman D, Chapron C. Gene expression profile for ectopic versus eutopic endometrium provides new insights into endometriosis oncogenic potential. *Mol Endocrinol* 22(11):2557-62, 2008.
- Brandes CJ, Carraway H, Herman JG. Optimal primer design using the novel primer design program: MSPprimer provides accurate methylation analysis of the ATM promoter, *Oncogene* 26 (42), 6229–6237, 2007.
- Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med* 360(3):268-79, 2009.
- Burney RO, Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Nyegaard M, Nezhat CR, Lessey BA, Giudice LC. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology* 148(8):3814-26, 2007.
- Callinan PA, Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 1:R95-101, 2006.
- Campbell IG, Thomas EJ. Endometriosis: candidate genes. *Hum Reprod Update* 7(1):15-20, 2001.
- Carro MS, Spiga FM, Quarto M, Di Ninni V, Volorio S, Alcalay M, Müller H. DEK Expression is controlled by E2F and deregulated in diverse tumor types. *Cell Cycle* 5(11):1202-7, 2006.
- Chand AL, Murray AS, Jones RL, Hannan NJ, Salamonsen LA, Rombauts L. Laser capture microdissection and cDNA array analysis of endometrium identify CCL16 and CCL21 as epithelial-derived inflammatory mediators associated with endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 5:18, 2007.
- Chango A, Abdennebi-Najar L, Tessier F, Ferré S, Do S, Guéant JL, Nicolas JP, Willequet F. Quantitative methylation-sensitive arbitrarily primed PCR method to determine differential genomic DNA methylation in Down Syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 349(2):492-6, 2006.
- Costa FF, Paixão VA, Cavalher FP, Ribeiro KB, Cunha IW, Rinck JA Jr, O'Hare M, Mackay A, Soares FA, Brentani RR, Camargo AA. SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 165(2):135-43, 2006.
- Crawford BD, Hess JL. MLL core components give the green light to histone methylation. *ACS Chem Biol* 1(8):495-8, 2006.
- Cui H. Loss of imprinting of IGF2 as an epigenetic marker for the risk of human cancer. *Dis Markers* 23(1-2):105-12, 2007.

- Daftary GS, Taylor HS. EMX2 gene expression in the female reproductive tract and aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 89(5):2390-6, 2004.
- Dahl JA, Collas P. Q2ChIP, a quick and quantitative chromatin immunoprecipitation assay, unravels epigenetic dynamics of developmentally regulated genes in human carcinoma cells. *Stem Cells* 25(4):1037-46, 2007.
- Dou Y, Milne TA, Ruthenburg AJ, Lee S, Lee JW, Verdine GL, Allis CD, Roeder RG. Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol* 13(8):713-9, 2006.
- Du Y, Jenkins NA, Copeland NG. Insertional mutagenesis identifies genes that promote the immortalization of primary bone marrow progenitor cells. *Blood* 106(12):3932-9, 2005.
- Duan Z, Zarebski A, Montoya-Durango D, Grimes HL, Horwitz M. Gfi1 coordinates epigenetic repression of p21<sup>Cip</sup>/WAF1 by recruitment of histone lysine methyltransferase G9a and histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 25(23):10338-51, 2005.
- Dupont JM, Tost J, Jammes H, Gut IG. De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Anal Biochem* 333(1):119-27, 2004.
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 28(8):E32, 2000.
- Espada J, Esteller M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Semin Cell Dev Biol* 21(2):238-46, 2010.
- Espina V, Milia J, Wu G, Cowherd S, Liotta LA. Laser capture microdissection. *Methods Mol Biol* 319:213-29, 2006.
- Estéicio MR, Yan PS, Ibrahim AE, Tellez CS, Shen L, Huang TH, Issa JP. High-throughput methylation profiling by MCA coupled to CpG island microarray. *Genome Res* 17(10):1529-36, 2007.
- Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8(4):286-98, 2007.
- Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Res*. 8(3):186-194, 1998.
- Eyster KM, Boles AL, Brannian JD, Hansen KA. DNA microarray analysis of gene expression markers of endometriosis. *Fertil Steril* 77(1):38-42, 2002.
- Fackler MJ, McVeigh M, Mehrotra J, Blum MA, Lapides J, Garret E, Argani P, Sukumar S. Quantitative Multiplex Methylation – Specific PCR Assay for the Detection of Promoter Hypermethylation in Multiple Genes in Breast Cancer. *Cancer Res* 64: 4442-52, 2004.
- Farquhar C. Endometriosis. *BMJ* 334(7587):249-53, 2007.



- Fazzari, MJ, Greally, JM. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat Rev Genet* 5(6):446-55, 2004.
- Feinberg AP. Methylation meets genomics. *Nat Genet* 27(1):9-10, 2001.
- Feinberg AP. Cancer epigenetics is no Mickey Mouse. *Cancer Cell* 8(4):267-8, 2005.
- Flores I, Rivera E, Ruiz LA, Santiago OI, Vernon MW, Appleyard CB. Molecular profiling of experimental endometriosis identified gene expression patterns in common with human disease. *Fertil Steril* 87(5):1180-99, 2007.
- Frost AR, Eltoum IE, Siegal GP. Laser capture microdissection. *Curr Protoc Mol Biol Chapter* 25:Unit 25A.1, 2001.
- Fukuda H, Sano N, Muto S, Horikoshi M. Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression. *Brief Func Genomic Proteomic* 5(3):190-208, 2006.
- Funato Y, Miki H. Nucleoredoxin, a novel thioredoxin family member involved in cell growth and differentiation. *Antioxid Redox Signal* 9(8):1035-57, 2007.
- Ge Z, Li W, Wang N, Liu C, Zhu Q, Björkholm M, Gruber A, Xu D. Chromatin remodeling: recruitment of histone demethylase RBP2 by Mad1 for transcriptional repression of a Myc target gene, telomerase reverse transcriptase. *FASEB J* 24(2):579-86, 2010.
- Gearhart MD, Corcoran CM, Wamstad JA, Bardwell VJ. Polycomb group and SCF ubiquitin ligases are found in a novel BCOR complex that is recruited to BCL6 targets. *Mol Cell Biol* 26(18):6880-9, 2006.
- Ghoshal K, Motiwala T, Claus R, Yan P, Kutay H, Datta J, Majumder S, Bai S, Majumder A, Huang T, Plass C, Jacob ST. HOXB13, a target of DNMT3B, is methylated at an upstream CpG island, and functions as a tumor suppressor in primary colorectal tumors. *PLoS One* 5(4):e10338, 2010.
- Girling JE, Rogers PA. Recent advances in endometrial angiogenesis research. *Angiogenesis* 8(2):89-99, 2005.
- Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 364(9447):1789-99, 2004.
- Goldstein M, Meller I, Orr-Urtreger A. FGFR1 over-expression in primary rhabdomyosarcoma tumors is associated with hypomethylation of a 5' CpG island and abnormal expression of the AKT1, NOG, and BMP4 genes. *Genes Chromosomes Cancer* 46(11):1028-38, 2007.
- Gonzalgo ML, Liang G, Spruck CH 3rd, Sing J-M, Rideout WM 3rd, Jones PA. Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR. *Cancer Res* 57(4):594-9, 1997.
- Grottke C, Mantwill K, Dietel M, Schadendorf D, Lage H. Identification of differentially expressed genes in human melanoma cells with acquired resistance to various antineoplastic drugs. *Int J Cancer* 88(4):535-46, 2000.

- Gu ZD, Shen LY, Wang H, Chen XM, Li Y, Ning T, Chen KN. HOXA13 promotes cancer cell growth and predicts poor survival of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 69(12):4969-73, 2009.
- Gui Y, Zhang J, Yuan L, Lessey BA. Regulation of HOXA10 and its expression in normal and abnormal endometrium. *Mol Hum Reprod* 5: 866-873, 1999.
- Guo SW. Recurrence of endometriosis and its control. *Hum Reprod Update* 15(4):441-61, 2009a.
- Guo SW. Epigenetics of endometriosis. *Mol Hum Reprod* 15(10):587-607, 2009b.
- Han L, Witmer PD, Casey E, Valle D, Sukumar S. DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Bio Therapy* 6(8): 1-5, 2007.
- Han L, Zhao Z. CpG islands or CpG clusters: how to identify functional GC-rich regions in a genome? *BMC Bioinformatics* 10:65, 2009.
- Han S, Xuan Y, Liu S, Zhang M, Jin D, Jin R, Lin Z. Clinicopathological significance of DEK overexpression in serous ovarian tumors. *Pathol Int* 59(7):443-7, 2009.
- Harada K, Yamazaki T, Iwata C, Yoshimatsu Y, Sase H, Mishima K, Morishita Y, Hirashima M, Oike Y, Suda T, Miura N, Watabe T, Miyazono K. Identification of targets of Prox1 during in vitro vascular differentiation from embryonic stem cells: functional roles of HoxD8 in lymphangiogenesis. *J Cell Sci* 122(Pt 21):3923-30, 2009.
- Hassan MH, Othman EE, Hornung D, Al-Hendy A. Gene therapy of benign gynecological diseases. *Adv Drug Deliv Rev* 61(10):822-35, 2009.
- Hellwinkel OJ, Kedia M, Isbarn H, Budäus L, Friedrich MG. Methylation of the TPEF- and PAX6-promoters is increased in early bladder cancer and in normal mucosa adjacent to pTa tumours. *BJU Int* 101(6):753-7, 2008.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(18):9821-6, 1996.
- Hever A, Roth RB, Hevezi P, Marin ME, Acosta JA, Acosta H, Rojas J, Herrera R, Grigoriadis D, White E, Conlon PJ, Maki RA, Zlotnik A. Human endometriosis is associated with plasma cells and overexpression of B lymphocyte stimulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(30):12451-6, 2007.
- Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Schindler JW, Saleque S, Fujiwara Y, Orkin SH. Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 431(7011):1002-7, 2004.
- Hsieh CH. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol Cell Biol* 14(8): 5487-5494, 1994.

- Hu WP, Tay SK, Zhao Y. Endometriosis-specific genes identified by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction expression profiling of endometriosis versus autologous uterine endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 91(1):228-38, 2006.
- Huang TH, Perry MR, Laux DE. Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Hum Mol Genet* 8(3):459-70, 1999.
- Hull ML, Escareno CR, Godsland JM, Doig JR, Johnson CM, Phillips SC, Smith SK, Tavaré S, Print CG, Charnock-Jones DS. Endometrial-peritoneal interactions during endometriotic lesion establishment. *Am J Pathol* 173(3):700-15, 2008.
- Huynh KD, Fischle W, Verdin E, Bardwell VJ. BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev* 14(14):1810-23, 2000.
- Hyllus D, Stein C, Schnabel K, Schiltz E, Imhof A, Dou Y, Hsieh J, Bauer UM. PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes Dev* 21(24):3369-80, 2007.
- Ibrahim AE, Thorne NP, Baird K, Barbosa-Morais NL, Tavaré S, Collins VP, Wyllis AH, Arends MJ, Brenton JD. MMASS: an optimized array-based method for assessing CpG island methylation. *Nucleic Acids Res* 34(20):e136, 2006.
- Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Carvalho B, Wu H, Brandenburg SA, Jeddloh JA, Wen B, Feinberg AP. Comprehensive high-throughput arrays for relative methylation (CHARM). *Genome Res* 18(5):780-90, 2008.
- Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash JB, Sabunciyan S, Feinberg AP. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet*, 41(2):178-86, 2009.
- Izawa M, Harada T, Taniguchi F, Ohama Y, Takenaka Y, Terakawa N. An epigenetic disorder may cause aberrant expression of aromatase gene in endometriotic stromal cells. *Fertil Steril* 89(5 Suppl):1390-6, 2008.
- Jafar-Nejad H, Bellen HJ. Gfi/Pag-3/senseless zinc finger proteins: a unifying theme? *Mol Cell Biol* 24(20):8803-12, 2004.
- Jung C, Kim RS, Lee SJ, Wang C, Jeng MH. HOXB13 homeodomain protein suppresses the growth of prostate cancer cells by the negative regulation of T-cell factor 4. *Cancer Res* 64(9):3046-51, 2004.
- Jung C, Kim RS, Zhang H, Lee SJ, Sheng H, Loehrer PJ, Gardner TA, Jeng MH, Kao C. HOXB13 is downregulated in colorectal cancer to confer TCF4-mediated transactivation. *Br J Cancer* 92(12):2233-9, 2005.
- Kamalakaran S, Kendall J, Zhao X, Tang C, Khan S, Ravi K, Auletta T, Riggs M, Wang Y, Helland A, Naume B, Dimitrova N, Børresen-Dale AL, Hicks J, Lucito R. Methylation

- detection oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method for detection of CpG island methylation. *Nucleic Acids Res* 37(12):e89, 2009.
- Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Osteen K, Lessey BA, Giudice LC. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 144(7):2870-81, 2003.
- Kaufmann E, Knöchel W. Five years on the wings of fork head. *Mech Dev* 57(1):3-20, 1996.
- Kazanjian A, Wallis D, Au N, Nigam R, Venken KJ, Cagle PT, Dickey BF, Bellen HJ, Gilks CB, Grimes HL. Growth factor independence-1 is expressed in primary human neuroendocrine lung carcinomas and mediates the differentiation of murine pulmonary neuroendocrine cells. *Cancer Res* 64(19):6874-82, 2004.
- Khulan B, Thompson RF, Ye K, Fazzari MJ, Suzuki M, Stasiak E, Figueroa ME, Glass JL, Chen Q, Montagna C, Hatchwell E, Selzer RR, Richmond TA, Green RD, Melnick A, Grealley JM. Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: the HELP assay. *Genome Res* 16(8):1046-55, 2006.
- Kim JJ, Taylor HS, Lu Z, Ladhani O, Hastings JM, Jackson KS, Wu Y, Guo SW, Fazleabas AT. Altered expression of HOXA10 in endometriosis: potential role in decidualization. *Mol Hum Reprod* 13(5):323-32, 2007.
- Kim DS, Kim MJ, Lee JY, Lee SM, Choi JY, Yoon GS, Na YK, Hong HS, Kim SG, Choi JE, Lee SY, Park JY. Epigenetic inactivation of Homeobox A5 gene in nonsmall cell lung cancer and its relationship with clinicopathological features. *Mol Carcinog* 48(12):1109-15, 2009.
- Kitawaki J, Kado N, Ishihara H, Koshiba H, Kitaoka Y, Honjo H. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83(1-5):149-55, 2002.
- Kohno T, Kawanishi M, Inazawa J, Yokota J. Identification of CpG islands hypermethylated in human lung cancer by the arbitrarily primed-PCR method. *Hum Genet* 102(3):258-64, 1998.
- Koinuma K, Kaneda R, Toyota M, Yamashita Y, Takada S, Choi YL, Wada T, Okada M, Konishi F, Nagai H, Mano H. Screening for genomic fragments that are methylated specifically in colorectal carcinoma with a methylated MLH1 promoter. *Carcinogenesis* 26(12):2078-85, 2005.
- Kondoh N, Wakatsuki T, Ryo A, Hada A, Aihara T, Horiuchi S, Goseki N, Matsubara O, Takenaka K, Shichita M, Tanaka K, Shuda M, Yamamoto M. Identification and characterization of genes associated with human hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* 59(19):4990-6, 1999.

- Kopp MU, Winterhalter KH, Trueb B. DNA methylation accounts for the inhibition of collagen VI expression in transformed fibroblasts. *Eur J Biochem* 249(2):489-96, 1997.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128(4):693-705, 2007.
- Lalam N. Estimation of the reaction efficiency in polymerase chain reaction. *J Theor Biol* 21;242(4):947-53, 2006.
- Laudanski P, Szamatowicz J, Kowalczyk O, Kuzmicki M, Grabowicz M, Chyczewski L. Expression of selected tumor suppressor and oncogenes in endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* 24(8):1880-90. 2009.
- Lee MP, Hu RJ, Johnson LA, Feinberg AP. Human KVLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 15(2):181-5, 1997.
- Lee MP, DeBaun MR, Mitsuya K, Galonek HL, Brandenburg S, Oshimura M, Feinberg AP. Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9):5203-8, 1999.
- Lee B, Du H, Taylor HS. Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium. *Biol Reprod* 80(1):79-85, 2009.
- Leontieva OV, Ionov Y. RNA-binding motif protein 35A is a novel tumor suppressor for colorectal cancer. *Cell Cycle* 8(3):490-7, 2009.
- Leshchenko VV, Kuo PY, Shaknovich R, Yang DT, Gellen T, Petrich A, Yu Y, Remache Y, Weniger MA, Rafiq S, Suh KS, Goy A, Wilson W, Verma A, Braunschweig I, Muthusamy N, Kahl BS, Byrd JC, Wiestner A, Melnick A, Parekh S. Genome wide DNA methylation analysis reveals novel targets for drug development in mantle cell lymphoma. *Blood* [Epub ahead of print], 2010.
- Lewis MT. Homeobox genes in mammary gland development and neoplasia. *Breast Cancer Res* 2(3):158-69, 2000.
- Li J, Protopopov A, Wang F, Senchenko V, Petushkov V, Vorontsova O, Petrenko L, Zabarovska V, Muravenko O, Braga E, Kisselev L, Lerman MI, Kashuba V, Klein G, Ernberg I, Wahlestedt C, Zabarovsky E. NotI subtraction and NotI-specific microarrays to detect copy number and methylation change in whole genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(16):10724-9, 2002.
- Liang G, Salem CE, Yu MC, Nguyen HD, Gonzales FA, Nguyen TT, Nichols PW, Jones PA. DNA methylation differences associated with tumor tissues identified by genome scanning analysis. *Genomics* 53(3):260-8, 1998.
- Liang G, Gonzalgo ML, Salem C, Jones PA. Identification of DNA methylation differences during tumorigenesis by methylation-sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Methods*. 27(2):150-5, 2002.

- Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462(7271):315-22, 2009.
- Lujambio A, Esteller M. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer. *Cell Cycle* 6(12):1455-9, 2007.
- Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Cespedes M, Git A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteller M. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 2007 Feb 15;67(4):1424-9. Erratum in: *Cancer Res* 67(7):3492, 2007.
- Mancini-Dinardo D, Steele SJ, Levorse JM, Ingram RS, Tilghman SM. Elongation of the *Kcnq1ot1* transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes. *Genes Dev* 20(10):1268-82, 2006.
- Martini M, Ciccarone M, Garganese G, Maggiore C, Evangelista A, Rahimi S, Zannoni G, Vittori G, Larocca LM. Possible involvement of hMLH1, p16(INK4a) and PTEN in the malignant transformation of endometriosis. *Int J Cancer* 102(4):398-406, 2002.
- Massé J, Watrin T, Laurent A, Deschamps S, Guerrier D, Pellerin I. The developing female genital tract: from genetics to epigenetics. *Int J Dev Biol* 53(2-3):411-24, 2009.
- Matsuzaki S, Canis M, Vaurs-Barrière C, Pouly JL, Boespflug-Tanguy O, Penault-Llorca F, Dechelotte P, Dastugue B, Okamura K, Mage G. DNA microarray analysis of gene expression profiles in deep endometriosis using laser capture microdissection. *Mol Hum Reprod* 10(10):719-28, 2004.
- Matsuzaki S, Canis M, Vaurs-Barrière C, Boespflug-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, 2005.
- McGhee L, Bryan J, Elliott L, Grimes HL, Kazanjian A, Davis JN, Meyers S. Gfi-1 attaches to the nuclear matrix, associates with ETO (MTG8) and histone deacetylase proteins, and represses transcription using a TSA-sensitive mechanism. *J Cell Biochem* 89(5):1005-18, 2003.
- McGuinness T, Porteus MH, Smiga S, Bulfone A, Kingsley C, Qiu M, Liu JK, Long JE, Xu D, Rubenstein JL. Sequence, organization, and transcription of the *Dlx-1* and *Dlx-2* locus. *Genomics* 35(3):473-85, 1996.
- Mishra DK, Chen Z, Wu Y, Sarkissyan M, Koeffler HP, Vadgama JV. Global methylation pattern of genes in androgen-sensitive and androgen-independent prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 9(1):33-45, 2010.

- Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S. Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* 124(9):1653-64, 1997.
- Morison IM, Reeve AE. A catalogue of imprinted genes and parent-of-origin effects in humans and animals. *Hum Mol Genet* 7(10):1599-609, 1998.
- Muthusamy V, Duraisamy S, Bradbury CM, Hobbs C, Curley DP, Nelson B, Bosenberg M. Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma. *Cancer Res* 66(23):11187-93, 2006.
- Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski W, Rozovskaia T, Wassell R, Dubois G, Mazo A, Croce CM, Canaani E. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* 10(5):1119-28, 2002.
- Negraes PD, Favaro FP, Camargo JL, Oliveira ML, Goldberg J, Rainho CA, Salvadori DM. DNA methylation patterns in bladder cancer and washing cell sediments: a perspective for tumor recurrence detection. *BMC Cancer* 8:238, 2008.
- Nezhat FR, Kalir T. Comparative immunohistochemical studies of endometriosis lesions and endometriotic cysts. *Fertil Steril* 78(4):820-4, 2002.
- Nezhat F, Datta MS, Hanson V, Pejovic T, Nezhat C, Nezhat C. The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review. *Fertil Steril* 90(5):1559-70, 2008.
- Noonan FC, Mutch DG, Ann Mallon M, Goodfellow PJ. Characterization of the homeodomain gene *EMX2*: sequence conservation, expression analysis, and a search for mutations in endometrial cancers. *Genomics* 76(1-3):37-44, 2001.
- Okuda H, Toyota M, Ishida W, Furihata M, Tsuchiya M, Kamada M, Tokino T, Shuin T. Epigenetic inactivation of the candidate tumor suppressor gene *HOXB13* in human renal cell carcinoma. *Oncogene* 25(12):1733-42, 2006.
- Omura N, Li CP, Li A, Hong SM, Walter K, Jimeno A, Hidalgo M, Goggins M. Genome-wide profiling of methylated promoters in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther* 7(7):1146-56, 2008.
- Ota T, Gilks CB, Longacre T, Leung PC, Auersperg N. *HOXA7* in epithelial ovarian cancer: interrelationships between differentiation and clinical features. *Reprod Sci* 14(6):605-14, 2007.
- Park K, Kim K, Rho SB, Choi K, Kim D, Oh SH, Park J, Lee SH, Lee JH. Homeobox *Msx1* interacts with p53 tumor suppressor and inhibits tumor growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 65(3):749-57, 2005.
- Pasqualucci L, Migliazza A, Basso K, Houldsworth J, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Mutations of the *BCL6* proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 101(8):2914-23, 2003.

- Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA. Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 26(21):5009-10, 1998.
- Pires AR, Andreiulo F da M, de Souza SR. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. *Diagn Pathol* 25;1:14, 2006.
- Polo SE, Almouzni G. Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. *Cancer Let* 220(1):1-9, 2005.
- Rainho CA, Pontes A, Rogatto SR. Expression and imprinting of insulin-like growth factor II (IGF2) and H19 genes in uterine leiomyomas. *Gynecol Oncol* 74(3):375-80, 1999.
- Raman V, Martensen SA, Reisman D, Evron E, Odenwald WF, Jaffee E, Marks J, Sukumar S. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature* 405(6789):974-8, 2000.
- Rando OJ. Chromatin structure in the genomics era. *Trends Genet* 23(2):67-73, 2006.
- Rauch T, Li H, Wu X, Pfeifer GP. MIRA-assisted microarray analysis, a new technology for the determination of DNA methylation patterns, identifies frequent methylation of homeodomain-containing genes in lung cancer cells. *Cancer Res* 66(16):7939-47, 2006.
- Rauch T, Wang Z, Zhang X, Zhong X, Wu X, Lau SK, Kernstine KH, Riggs AD, Pfeifer GP. Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(13):5527-32, 2007.
- Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 67(5):817-21, 1997.
- Rodriguez BA, Cheng AS, Yan PS, Potter D, Agosto-Perez FJ, Shapiro CL, Huang TH. Epigenetic repression of the estrogen-regulated Homeobox B13 gene in breast cancer. *Carcinogenesis* 29(7):1459-65, 2008.
- Rogers A, Sparkes N, Zhou D, Brenner V, Speight G. A Cost-effective High-throughput MicroRNA Profiling Service Based on Array and Non-enzymatic Labeling Technologies. *BioTech* 45(5):588-589, 2008.
- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Barrios M, Andreu EJ, Prosper F, Heiniger A, Torres A. Transcriptional silencing of the Dickkopfs-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* 91(4):707-13, 2004.
- Saitta B, Stokes DG, Vissin H, Timpl R, Chu ML. Alternative splicing of the human alpha 2(VI) collagen gene generates multiple mRNA transcripts which predict three protein variants with distinct carboxyl termini. *J Biol Chem* 265(11):6473-80, 1990.



- Saitta B, Chu ML. Two promoters control the transcription of the human alpha 2(VI) collagen gene. *Eur J Biochem* 223(2):675-82, 1994.
- Salem CE, Markl ID, Bender CM, Gonzales FA, Jones PA, Liang G. PAX6 methylation and ectopic expression in human tumor cells. *Int J Cancer* 87(2):179-85, 2000.
- Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 14:422-69, 1927.
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTech*. 17:914-921, 1994.
- Sasson IE, Taylor HS. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 1127:106-15, 2008.
- Schumacher A, Kapranov P, Kaminsky Z, Flanagan J, Assadzadeh A, Yau P, Virtanen C, Winegarden N, Cheng J, Gingeras T, Petronis A. Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. *Nucleic Acids Res* 34(2):528-42, 2006.
- Shames DS, Girard L, Gao B, Sato M, Lewis CM, Shivapurkar N, Jiang A, Perou CM, Kim YH, Pollack JR, Fong KM, Lam CL, Wong M, Shyr Y, Nanda R, Olopade OI, Gerald W, Euhus DM, Shay JW, Gazdar AF, Minna JD. A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies. *PLoS Med* 3(12):e486, 2006.
- Sharpe-Timms KL. Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 943:131-47, 2001.
- Sherwin JR, Sharkey AM, Mihalyi A, Simsa P, Catalano RD, D'Hooghe TM. 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.
- Shim C, Zhang W, Rhee CH, Lee JH. Profiling of differentially expressed genes in human primary cervical cancer by complementary DNA expression array. *Clin Cancer Res* 4(12):3045-50, 1998.
- Shroyer NF, Wallis D, Venken KJ, Bellen HJ, Zoghbi HY. Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes Dev* 19(20):2412-7, 2005.
- Siegmund KD, Laird PW. Analysis of complex methylation data. *Methods* 27(2):170-8, 2002.
- Strathdee G, Holyoake TL, Sim A, Parker A, Oscier DG, Melo JV, Meyer S, Eden T, Dickinson AM, Mountford JC, Jorgensen HG, Soutar R, Brown R. Inactivation of HOXA genes by hypermethylation in myeloid and lymphoid malignancy is frequent and associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 13(17):5048-55, 2007.
- Su X, Drabkin H, Clappier E, Morgado E, Busson M, Romana S, Soulier J, Berger R, Bernard OA, Lavau C. Transforming potential of the T-cell acute lymphoblastic leukemia-

- associated homeobox genes HOXA13, TLX1, and TLX3. *Genes Chromosomes Cancer* 45(9):846-55, 2006.
- Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, Van Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hihoda Y, Imai K, Herman JG, Baylin SB. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 36(4):417-22, 2004.
- Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A, Alonso S, Horiuchi S, Yamashita K, Perucho M. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell* 9(3):199-207, 2006.
- Szabó PE, Tang SH, Rentsendorj A, Pfeifer GP, Mann JR. Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function. *Curr Biol* 10(10):607-10, 2000.
- Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:3740-5, 2002.
- Taylor HS, Arici A, Olive D, Igarashi P. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest* 101(7):1379-84, 1998.
- Thakur N, Kanduri M, Holmgren C, Mukhopadhyay R, Kanduri C. Bidirectional silencing and DNA methylation-sensitive methylation-spreading properties of the Kcnq1 imprinting control region map to the same regions. *J Biol Chem* 278(11):9514-9, 2003.
- Thakur N, Tiwari VK, Thomassin H, Pandey RR, Kanduri M, Göndör A, Grange T, Ohlsson R, Kanduri C. An antisense RNA regulates the bidirectional silencing property of the Kcnq1 imprinting control region. *Mol Cell Biol* 24(18):7855-62, 2004.
- Thomas EJ, Campbell IG. Evidence that endometriosis behaves in a malignant manner. *Gynecol Obstet Invest* 50 Suppl 1:2-10, 2000.
- Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 59(10):2307-12, 1999.
- Troy PJ, Daftary GS, Bagot CN, Taylor HS. Transcriptional repression of peri-implantation EMX2 expression in mammalian reproduction by HOXA10. *Mol Cell Biol* 23(1):1-13, 2003.
- Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer* 5:223-31, 2005.
- Waldmann T, Scholten I, Kappes F, Hu HG, Knippers R. The DEK protein—an abundant and ubiquitous constituent of mammalian chromatin. *Gene* 343(1):1-9, 2004.
- Wallis D, Hamblen M, Zhou Y, Venken KJ, Schumacher A, Grimes HL, Zoghbi HY, Orkin SH, Bellen HJ. The zinc finger transcription factor Gfi1, implicated in lymphomagenesis, is

- required for inner ear hair cell differentiation and survival. *Development* 130(1):221-32, 2003.
- Wang Z, Dahiya S, Provencher H, Muir B, Carney E, Coser K, Shioda T, Ma XJ, Sgroi DC. The prognostic biomarkers HOXB13, IL17BR, and CHDH are regulated by estrogen in breast cancer. *Clin Cancer Res* 13(21):6327-34, 2007.
- Wise-Draper TM, Allen HV, Jones EE, Habash KB, Matsuo H, Wells SI. Apoptosis inhibition by the human DEK oncoprotein involves interference with p53 functions. *Mol Cell Biol* 26(20):7506-19, 2006.
- Wood C. Adenomyosis: difficult to diagnose, and difficult to treat. *Diagn Ther Endosc* 7(2):89-95, 2001.
- Wu TD. Analysing gene expression data from DNA microarrays to identify candidate genes. *J Pathol* 195(1):53-65, 2001.
- Wu Y, Halverson G, Basir Z, Strawn E, Yan P, Guo SW. Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 193: 371-380, 2005.
- Wu Y, Kajdacsy-Balla A, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Jailwala P, Wang Y, Wang X, Ghosh S, Guo SW. Transcriptional characterizations of differences between eutopic and ectopic endometrium. *Endocrinology*.147(1):232-46, 2006a.
- Wu Y, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Guo SW. Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (PR-B) in endometriosis. *Epigenetics* 1: 106-111, 2006b.
- Wu MH, Shoji Y, Chuang PC, Tsai SJ. Endometriosis: disease pathophysiology and the role of prostaglandins. *Expert Rev Mol Med* 9(2):1-20, 2007a.
- Wu Y, Starzinski-Powitz A, Guo SW. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, attenuates invasiveness and reactivates E-cadherin expression in immortalized endometriotic cells. *Reprod Sci* 14(4):374-82, 2007b.
- Wu Y, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Guo SW. Aberrant expression of deoxyribonucleic acid methyltransferase DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in women with endometriosis. *Fertil Steril* 87: 24-32, 2007c
- Wu Q, Li Z, Lin H, Han L, Liu S, Lin Z. DEK overexpression in uterine cervical cancers. *Pathol Int* 58(6):378-82, 2008.
- Wu X, Rauch TA, Zhong X, Bennett WP, Latif F, Krex D, Pfeifer GP. CpG island hypermethylation in human astrocytomas. *Cancer Res* 70(7):2718-27, 2010.
- Wysocka J, Swigut T, Milne TA, Dou Y, Zhang X, Burlingame AL, Roeder RG, Brivanlou AH, Allis CD. WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* 121(6):859-72, 2005.
- Xia SJ, Pressey JG, Barr FG. Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer Biol Ther* 1(2):97-104, 2002.

- Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 25(12):2532-4, 1997.
- Xue Q, Lin Z, Cheng YH, Huang CC, Marsh E, Yin P, Milad MP, Confino E, Reierstad S, Innes J, Bulun SE. Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 (ESR2) in endometrium and endometriosis. *Biol Reprod* 77(4):681-7, 2007a.
- Xue Q, Lin Z, Yin P, Milad MP, Cheng YH, Confino E, Reierstad S, Bulun SE. Transcriptional activation of steroidogenic factor-1 by hypomethylation of the 5' CpG island in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 92(8): 3261-3267, 2007b.
- Yamada Y, Watanabe H, Miura F, Soejima H, Uchiyama M, Iwasaka T, Mukai T, Sakaki Y, Ito T. A comprehensive analysis of allelic methylation status of CpG islands on human chromosome 21q. *Genome Res* 14(2):247-66, 2004.
- Yamashita S, Tsujino Y, Moriguchi K, Tatematsu M, Ushijima T. Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer Sci* 97(1):64-71, 2006.
- Yaoi T, Itoh K, Nakamura K, Ogi H, Fujiwara Y, Fushiki S. Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun* 376(3):563-7, 2008.
- Yau TO, Chan CY, Chan KL, Lee MF, Wong CM, Fan ST, Ng IO. HDPR1, a novel inhibitor of the WNT/beta-catenin signaling, is frequently downregulated in hepatocellular carcinoma: involvement of methylation-mediated gene silencing. *Oncogene* 24(9):1607-14, 2005.
- Yoshida M, Suda Y, Matsuo I, Miyamoto N, Takeda N, Kuratani S, Aizawa S. Emx1 and Emx2 functions in development of dorsal telencephalon. *Development* 124(1):101-11, 1997.
- Yoshida M, Nosaka K, Yasunaga J, Nishikata I, Morishita K, Matsuoka M. Aberrant expression of the MEL1S gene identified in association with hypomethylation in adult T-cell leukemia cells. *Blood* 103(7):2753-60, 2004.
- Yu YP, Yu G, Tseng G, Cieply K, Nelson J, Defrances M, Zarnegar R, Michalopoulos G, Luo JH. Glutathione peroxidase 3, deleted or methylated in prostate cancer, suppresses prostate cancer growth and metastasis. *Cancer Res* 67(17):8043-50, 2007.
- Yu M, Smolen GA, Zhang J, Wittner B, Schott BJ, Brachtel E, Ramaswamy S, Maheswaran S, Haber DA. A developmentally regulated inducer of EMT, LBX1, contributes to breast cancer progression. *Genes Dev* 23(15):1737-42, 2009.
- Zafrakas M, Tarlatzis BC, Streichert T, Pournaropoulos F, Wölfle U, Smeets SJ, Wittek B, Grimbizis G, Brakenhoff RH, Pantel K, Bontis J, Günes C. Genome-wide microarray gene expression, array-CGH analysis, and telomerase activity in advanced ovarian

endometriosis: a high degree of differentiation rather than malignant potential. *Int J Mol Med* 21(3):335-44, 2008.

Zhou Y, Kato H, Asanoma K, Kondo H, Arima T, Kato K, Matsuda T, Wake N. Identification of FOXC1 as a TGF-beta1 responsive gene and its involvement in negative regulation of cell growth. *Genomics* 80(5):465-72, 2002.

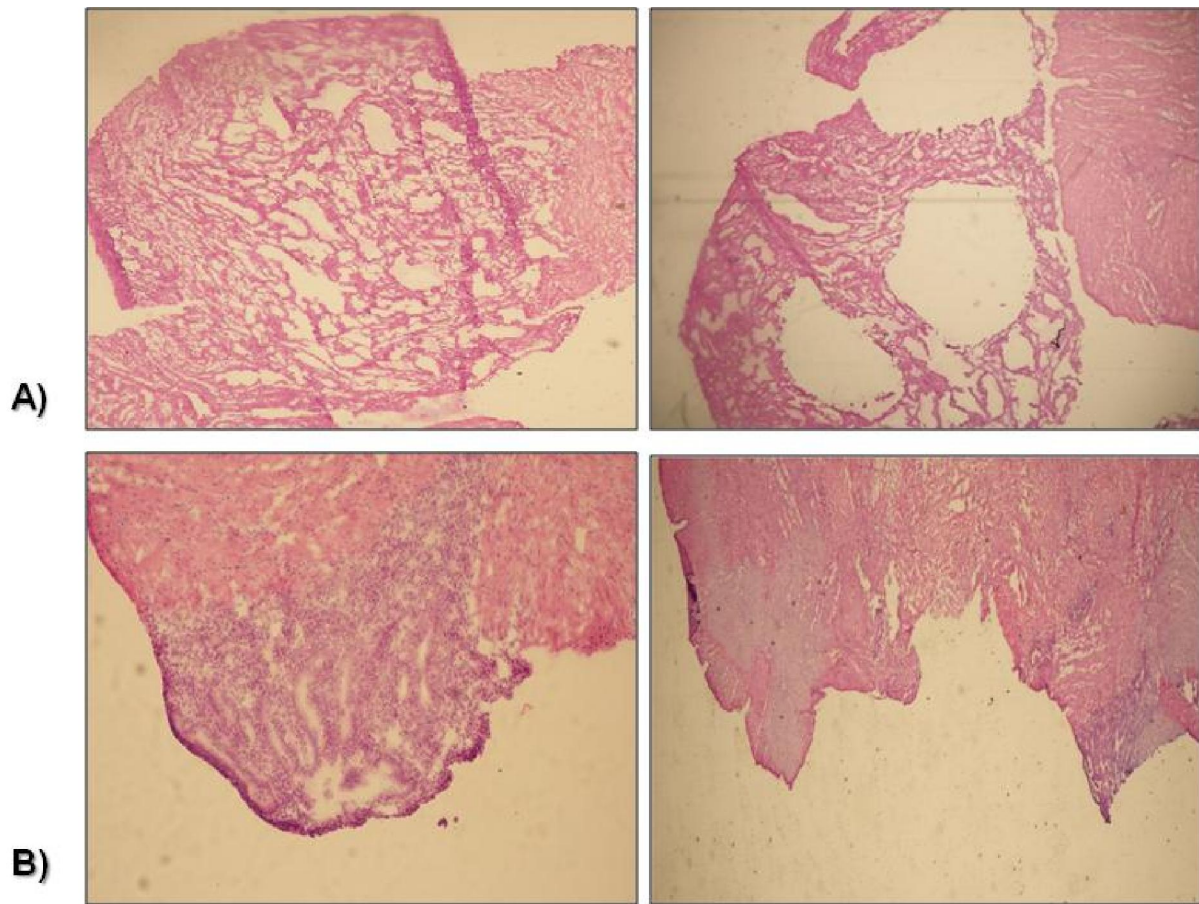
Zweidler-Mckay PA, Grimes HL, Flubacher MM, Tschlis PN. Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 16(8):4024-34, 1996.

# Apêndice

## ETAPAS PRELIMINARES À IDENTIFICAÇÃO DOS PERFIS DIFERENCIAIS DE METILAÇÃO DO DNA NA ENDOMETRIOSE BASEADA NA TRIAGEM GENÔMICA DE MICROARRANJOS DE ILHAS CpG

A microdissecção manual foi realizada em 17 das 18 amostras pareadas de endometriose selecionadas para a análise do perfil de metilação do DNA baseada na hibridação na plataforma *Human CpG Island Chip-on-Chip 244K (Agilent Technologies)*: uma amostra foi descartada (caso 178) porque não foram observadas lesões endometrióticas após o preparo de lâminas contendo cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina. No anexo IV estão apresentados os dados clínicos das 17 amostras utilizadas no estudo.

Na Figura 12 estão apresentadas fotomicrografias do tecido corado com hematoxilina e eosina provenientes de duas amostras antes e após a microdissecção (casos 190 e 207). Nota-se que as lesões endometrióticas nos dois casos apresentam-se como regiões bastante homogêneas favorecendo o procedimento de microdissecção manual.



**Figura 12.** Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina antes e após a microdissecação manual referentes ao caso 190 (A) e ao caso 207 (B).

Para a padronização da etapa de marcação e hibridação foi selecionada a amostra pareada 190. Embora a quantidade de DNA recomendada para hibridação nas lâminas de 244k seja de 1500ng, a marcação com cianinas foi realizada com aproximadamente 940ng de DNA, sendo que o DNA proveniente do endométrio eutópico foi marcado com Cy5 e o do endométrio ectópico, marcado com Cy3.

A incorporação das cianinas ao DNA foi baixa sendo que os valores de Cy5 ficaram em torno de 0,5% em ambas as frações e de Cy3, 0,46% na fração metilada e 1,01% na fração não metilada (ANEXO V). Dessa forma, optou-se por efetuar apenas a hibridação da fração não-metilada na lâmina de 244K para se avaliar como



estaria a intensidade de fluorescência em uma primeira comparação entre a amostra de endométrio eutópico e ectópico.

Posteriormente, os dados foram extraídos pelo *software Feature Extraction 10.5.1.1* e os parâmetros de qualidade descritos em Material e Métodos foram avaliados. Como esperado, estes ficaram abaixo dos limites aceitáveis, os quais podem refletir a quantidade inicial de DNA para a marcação e hibridação estar abaixo da recomendada. As análises prosseguiram com o uso dos *softwares Agilent Technologies Genomic Workbench (DNA Analytics 5.0)* e *GeneSpring 7.3 (Agilent Technologies Technologies)*.

Posteriormente, o mesmo protocolo foi realizado em outro par de amostras (caso 185). A marcação e hibridação foi realizada com uma quantidade de DNA de 1500ng (como recomendado) e em lâminas réplicas. Além disso, a marcação foi realizada como *dye swap*. em uma réplica o endométrio eutópico foi marcado com Cy5 e o ectópico foi marcado com Cy3 e na outra réplica essa marcação foi invertida.

Como as eficiências ficaram dentro dos limites desejados, ambas as frações foram hibridadas nas lâminas de 244K (ANEXO V).

Todos os parâmetros de qualidade ficaram dentro dos limites aceitáveis, com exceção do DLRS, que ultrapassou levemente o valor aceitável em três das quatro lâminas hibridadas (ANEXO VI). Mesmo assim, todas foram consideradas nas análises posteriores em função da observação do gráfico de dispersão (gerado pelo *software Feature Extraction*) entre os sinais de Cy3 e Cy5 corrigidos pelo *background* mostrarem uma correlação linear. Uma das lâminas réplicas referente à fração metilada, entretanto, obteve os piores parâmetros, particularmente para a cianina Cy5 (DLRS: 0,72; intensidade do sinal: 32,33 e *signal-to-noise*: 12,11), mas

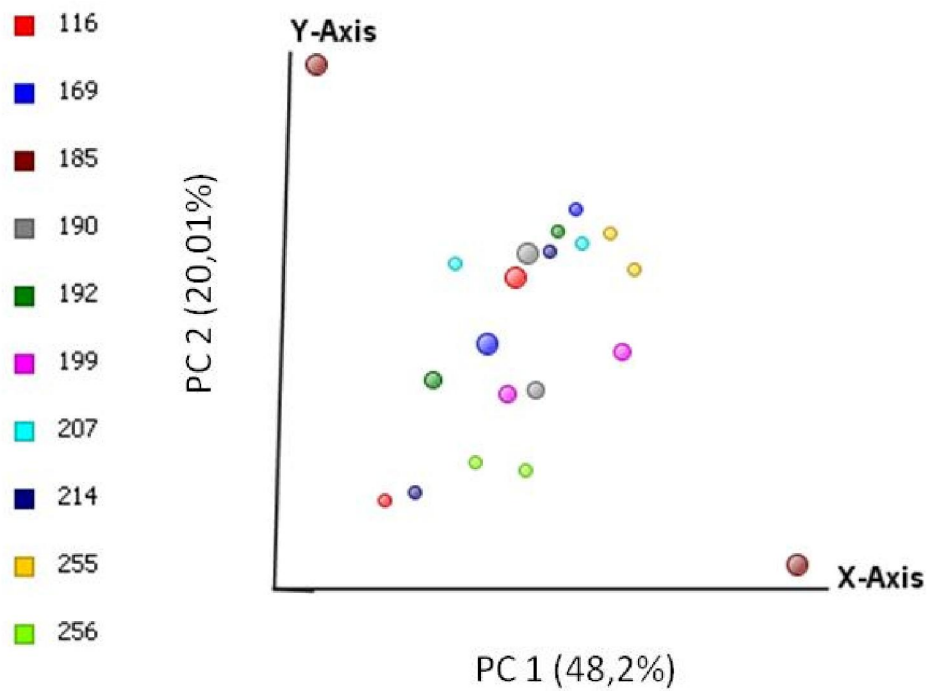
também foi considerada nas análises subsequentes, pela análise dos dados de dispersão.

Após a avaliação dos resultados de hibridação do caso (185), o pequeno número de sondas que desviaram quanto à intensidade dos sinais fluorescentes, levou à hipótese de que estava ocorrendo saturação dos reagentes devido ao grande número de ciclos de amplificação pela PCR segundo as condições estabelecidas no protocolo SCOMP-GD (Lalam, 2006). Para se evitar que a reação de amplificação atingisse a fase de platô e visando o aumento na probabilidade de detecção de diferenças entre as amostras co-hibridadas, o protocolo foi modificado conforme descrito por Ibrahim et al., 2006.

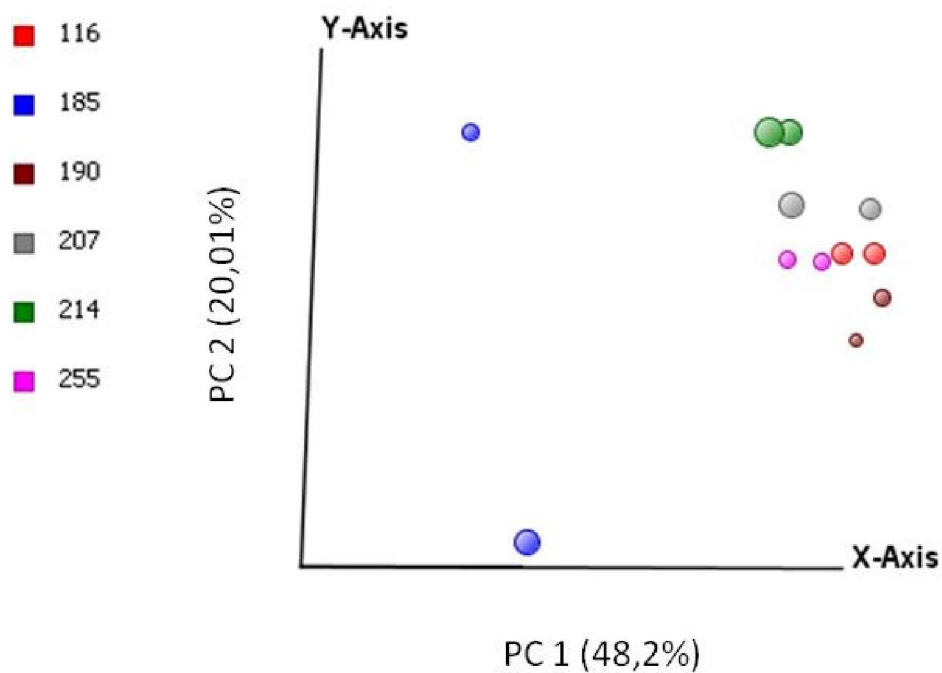
No grupo experimental foram empregadas modificações como as condições de amplificação, as quantidades de DNA inicial para as marcações com cianinas foram de 1500ng (como recomendado), as amostras de endométrio eutópico foram marcadas com Cy3 e de endométrio ectópico foram marcadas com Cy5 e as hibridações foram realizadas em réplicas.

Como a etapa de amplificação do caso 185 foi diferente da dos demais casos, resultando numa saturação dos reagentes e assim, ineficiência desta etapa, a quantidade de genes diferencialmente metilados significantes obtidos foi pequena nas duas frações. Dessa forma, este caso foi excluído das análises posteriores. A Figura 13 ilustra a classificação das amostras baseado na análise dos três componentes principais (PCA).

### Fração metilada



### Fração não metilada



**Figura 13.** Gráfico de dispersão ilustrando os dois componentes principais de um PCA. Pode-se observar a similaridade entre as réplicas de todas as amostras com exceção do caso 185. Os casos estão representados com cores diferentes conforme legenda à esquerda.

**Anexos**

## ANEXO I



# APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24/09/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0531/08**, intitulado: "**IDENTIFICAÇÃO DE PERFIS DIFERENCIAIS DE METILAÇÃO DO DNA NA ENDOMETRIOSE**" apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

Pesquisador (a) Responsável: **Maurício Simões Abrão**

Pesquisadores Executantes: **Daniela Zimbardi, Cláudia Aparecida Rainho, Sílvia Regina Rogatto**

CAPPesq, 25 de Setembro de 2008

**Prof. Dr. Eduardo Massad**  
**Presidente da Comissão de**  
**Ética para Análise de Projetos**  
**de Pesquisa**

## ANEXO II



*HOSPITAL DAS CLÍNICAS*  
*DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO*  
*CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL*

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

1. NOME: .....

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

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

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

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

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

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

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

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

#### II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

##### 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Identificação de perfis diferenciais de metilação do DNA na endometriose

##### 2. PESQUISADOR: Prof.Dr.Maurício Simões Abrão

##### 3. CARGO/FUNÇÃO: Professor Livre Docente da Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 52.842

##### 4. UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Ginecologia HCFMUSP

##### 5. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO

RISCO MÍNIMO **X**

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

##### 6. DURAÇÃO DA PESQUISA: 03 anos

SEM RISCO

RISCO MÍNIMO **X**

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

1. **Objetivos da pesquisa:** Avaliar possíveis alterações genéticas que possam estar relacionadas à endometriose e, assim, obter um conhecimento melhor desta doença. Desta forma, auxiliar também no desenvolvimento de novas possibilidades de diagnóstico e tratamento.

2. **Procedimentos utilizados:** Os estudos realizados por nossa equipe de pesquisadores precisam de material a fresco, proveniente das lesões obtidas no momento da cirurgia, para que seja possível a análise destas células em laboratório. Esta amostra será obtida pelo médico durante a cirurgia com objetivo de avaliação e tratamento das causas dos seus sintomas (como dores abdominais ou dificuldade para engravidar) que tem como uma provável causa a endometriose. Nesta doença, o endométrio, que é a parte do útero que se desprende e sangra durante a menstruação, pode crescer fora do útero, em outros lugares, como os ovários, o tecido que reveste o abdome internamente (chamado de peritônio) e outras localizações como o intestino, bexiga e outros órgãos. Para o tratamento da sua doença, a senhora será submetida a uma cirurgia e durante o ato cirúrgico fragmentos do tecido serão retirados por apresentarem endometriose. Estes fragmentos serão enviados para exame anátomo-patológico (no qual se utiliza um microscópio para avaliar cortes muito finos das amostras coletadas durante a cirurgia). Assim, solicitamos sua autorização para que uma pequena porção da endometriose possa ser utilizada em nosso estudo para se conhecer melhor as causas da doença e novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Os pequenos fragmentos do tecido doente retirados na cirurgia não comprometerão o diagnóstico da doença. As análises são realizadas em etapas e o fragmento de tecido coletado será identificado no laboratório por códigos de números, preservando assim sua identidade, e armazenado num banco de amostras exclusivas para estas pesquisas.

3. **Complicações, desconfortos e riscos:** Esclarecemos que não haverá desconforto físico adicional, uma vez que o desconforto referente à coleta do material ocorrerá apenas quando o médico realizar procedimentos específicos para fins de diagnóstico ou tratamento da endometriose. Pedimos também sua autorização para que parte desse material possa ser armazenado, sob responsabilidade dos pesquisadores, para estudos futuros.

4. **Benefícios:** Os resultados do estudo não trarão benefícios para sua pessoa, mas poderão contribuir, no futuro, para melhores condições de tratamento da endometriose.

5. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. Dr. Maurício Simões Abrão, que pode ser encontrado no consultório que fica a Rua São Sebastião 55, Santo Amaro e o número do telefone de seu consultório é (11) 5182-8205, durante o horário comercial ou pelo *pager* (11) 4196-7060, código 100.0874, após este horário ou durante os finais de semana ou feriados.

6. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento e acompanhamento médico na Instituição.

7. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, sua identidade não será revelada e será mantido o caráter confidencial de todas as informações. Os resultados do estudo serão divulgados em congressos científicos e publicados em revistas especializadas, não sendo divulgada a identidade de nenhum paciente.

8. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

9. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Identificação de perfis diferenciais de metilação do DNA na endometriose". Eu discuti com o *Dr. Maurício Simões Abrão* sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.



-----  
Assinatura do paciente/representante legal      Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

-----  
Assinatura da testemunha      Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de  
deficiência auditiva ou visual.

*(Somente para o responsável do projeto)*

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

-----  
Assinatura do responsável pelo estudo      Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### ANEXO III

Estadiamento da endometriose proposto pela *American Society for Reproductive Medicine* (1997).



#### THE AMERICAN FERTILITY SOCIETY REVISED CLASSIFICATION OF ENDOMETRIOSIS

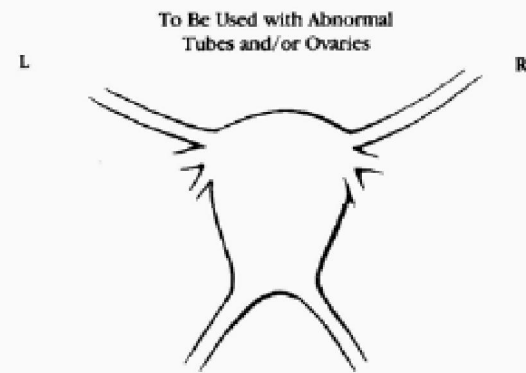
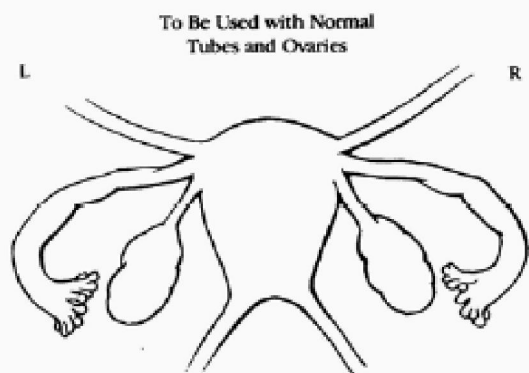
Patient's Name \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_  
 Stage I (Minimal) - 1-5      Laparoscopy \_\_\_\_\_ Laparotomy \_\_\_\_\_ Photography \_\_\_\_\_  
 Stage II (Mild) - 6-15      Recommended Treatment \_\_\_\_\_  
 Stage III (Moderate) - 16-40  
 Stage IV (Severe) - >40  
 Total \_\_\_\_\_ Prognosis \_\_\_\_\_

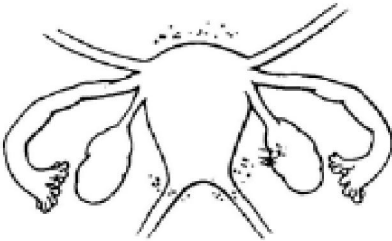
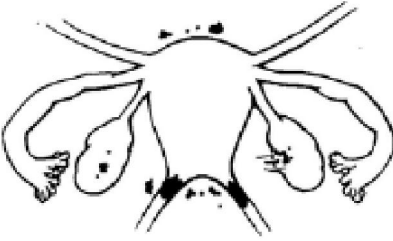

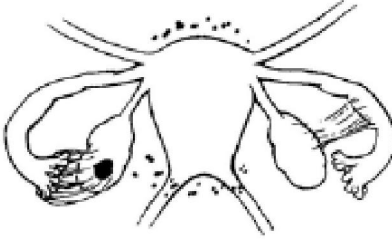
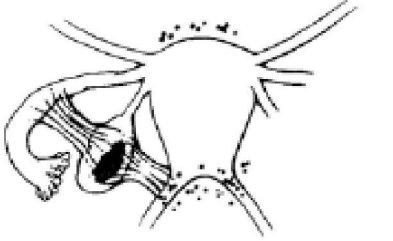

PERITONEUM	ENDOMETRIOSIS	< 1cm	1-3cm	> 3cm	
	Superficial	1	2	4	
Deep	2	4	6		
OVARY	R Superficial	1	2	4	
	Deep	4	16	20	
	L Superficial	1	2	4	
	Deep	4	16	20	
POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION		Partial	Complete		
		4	40		
OVARY	ADHESIONS	< 1/3 Enclosure	1/3-2/3 Enclosure	> 2/3 Enclosure	
	R Filmy	1	2	4	
	Dense	4	8	16	
	L Filmy	1	2	4	
	Dense	4	8	16	
	TUBE	R Filmy	1	2	4
		Dense	4*	8*	16
		L Filmy	1	2	4
Dense		4*	8*	16	

\*If the fimbriated end of the fallopian tube is completely enclosed, change the point assignment to 16.

Additional Endometriosis: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Associated Pathology: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_



STAGE I (MINIMAL)	STAGE II (MILD)	STAGE III (MODERATE)																																																																																																			
																																																																																																					
<table border="0"> <tr><td colspan="3">PERITONEUM</td></tr> <tr><td>Superficial Endo</td><td>- 1-3cm</td><td>- 2</td></tr> <tr><td colspan="3">R. OVARY</td></tr> <tr><td>Superficial Endo</td><td>- &lt; 1cm</td><td>- 1</td></tr> <tr><td>Filmy Adhesions</td><td>- &lt; 1/3</td><td>- 1</td></tr> <tr><td colspan="2">TOTAL POINTS</td><td><u>4</u></td></tr> </table>	PERITONEUM			Superficial Endo	- 1-3cm	- 2	R. OVARY			Superficial Endo	- < 1cm	- 1	Filmy Adhesions	- < 1/3	- 1	TOTAL POINTS		<u>4</u>	<table border="0"> <tr><td colspan="3">PERITONEUM</td></tr> <tr><td>Deep Endo</td><td>- &gt; 3cm</td><td>- 6</td></tr> <tr><td colspan="3">R. OVARY</td></tr> <tr><td>Superficial Endo</td><td>- &lt; 1cm</td><td>- 1</td></tr> <tr><td>Filmy Adhesions</td><td>- &lt; 1/3</td><td>- 1</td></tr> <tr><td colspan="3">L. OVARY</td></tr> <tr><td>Superficial Endo</td><td>- &lt; 1cm</td><td>- 1</td></tr> <tr><td colspan="2">TOTAL POINTS</td><td><u>9</u></td></tr> </table>	PERITONEUM			Deep Endo	- > 3cm	- 6	R. OVARY			Superficial Endo	- < 1cm	- 1	Filmy Adhesions	- < 1/3	- 1	L. OVARY			Superficial Endo	- < 1cm	- 1	TOTAL POINTS		<u>9</u>	<table border="0"> <tr><td colspan="3">PERITONEUM</td></tr> <tr><td>Deep Endo</td><td>- &gt; 3cm</td><td>- 6</td></tr> <tr><td colspan="3">CULDESAC</td></tr> <tr><td>Partial Obliteration</td><td></td><td>- 4</td></tr> <tr><td colspan="3">L. OVARY</td></tr> <tr><td>Deep Endo</td><td>- 1-3cm</td><td>- 16</td></tr> <tr><td colspan="2">TOTAL POINTS</td><td><u>26</u></td></tr> </table>	PERITONEUM			Deep Endo	- > 3cm	- 6	CULDESAC			Partial Obliteration		- 4	L. OVARY			Deep Endo	- 1-3cm	- 16	TOTAL POINTS		<u>26</u>																																				
PERITONEUM																																																																																																					
Superficial Endo	- 1-3cm	- 2																																																																																																			
R. OVARY																																																																																																					
Superficial Endo	- < 1cm	- 1																																																																																																			
Filmy Adhesions	- < 1/3	- 1																																																																																																			
TOTAL POINTS		<u>4</u>																																																																																																			
PERITONEUM																																																																																																					
Deep Endo	- > 3cm	- 6																																																																																																			
R. OVARY																																																																																																					
Superficial Endo	- < 1cm	- 1																																																																																																			
Filmy Adhesions	- < 1/3	- 1																																																																																																			
L. OVARY																																																																																																					
Superficial Endo	- < 1cm	- 1																																																																																																			
TOTAL POINTS		<u>9</u>																																																																																																			
PERITONEUM																																																																																																					
Deep Endo	- > 3cm	- 6																																																																																																			
CULDESAC																																																																																																					
Partial Obliteration		- 4																																																																																																			
L. OVARY																																																																																																					
Deep Endo	- 1-3cm	- 16																																																																																																			
TOTAL POINTS		<u>26</u>																																																																																																			
STAGE III (MODERATE)	STAGE IV (SEVERE)	STAGE IV (SEVERE)																																																																																																			
																																																																																																					
<table border="0"> <tr><td colspan="3">PERITONEUM</td></tr> <tr><td>Superficial Endo</td><td>- &gt; 3cm</td><td>- 4</td></tr> <tr><td colspan="3">R. TUBE</td></tr> <tr><td>Filmy Adhesions</td><td>- &lt; 1/3</td><td>- 1</td></tr> <tr><td colspan="3">R. OVARY</td></tr> <tr><td>Filmy Adhesions</td><td>- &lt; 1/3</td><td>- 1</td></tr> <tr><td colspan="3">L. TUBE</td></tr> <tr><td>Dense Adhesions</td><td>- &lt; 1/3</td><td>- 16*</td></tr> <tr><td colspan="3">L. OVARY</td></tr> <tr><td>Deep Endo</td><td>- &lt; 1 cm</td><td>- 4</td></tr> <tr><td>Dense Adhesions</td><td>- &lt; 1/3</td><td>- 4</td></tr> <tr><td colspan="2">TOTAL POINTS</td><td><u>30</u></td></tr> </table>	PERITONEUM			Superficial Endo	- > 3cm	- 4	R. TUBE			Filmy Adhesions	- < 1/3	- 1	R. OVARY			Filmy Adhesions	- < 1/3	- 1	L. TUBE			Dense Adhesions	- < 1/3	- 16*	L. OVARY			Deep Endo	- < 1 cm	- 4	Dense Adhesions	- < 1/3	- 4	TOTAL POINTS		<u>30</u>	<table border="0"> <tr><td colspan="3">PERITONEUM</td></tr> <tr><td>Superficial Endo</td><td>- &gt; 3cm</td><td>- 4</td></tr> <tr><td colspan="3">L. OVARY</td></tr> <tr><td>Deep Endo</td><td>- 1-3cm</td><td>- 32**</td></tr> <tr><td>Dense Adhesions</td><td>- &lt; 1/3</td><td>- 8**</td></tr> <tr><td colspan="3">L. TUBE</td></tr> <tr><td>Dense Adhesions</td><td>- &lt; 1/3</td><td>- 8**</td></tr> <tr><td colspan="2">TOTAL POINTS</td><td><u>52</u></td></tr> </table> <p>*Point assignment changed to 16  **Point assignment doubled</p>	PERITONEUM			Superficial Endo	- > 3cm	- 4	L. OVARY			Deep Endo	- 1-3cm	- 32**	Dense Adhesions	- < 1/3	- 8**	L. TUBE			Dense Adhesions	- < 1/3	- 8**	TOTAL POINTS		<u>52</u>	<table border="0"> <tr><td colspan="3">PERITONEUM</td></tr> <tr><td>Deep Endo</td><td>- &gt; 3cm</td><td>- 6</td></tr> <tr><td colspan="3">CULDESAC</td></tr> <tr><td>Complete Obliteration</td><td></td><td>- 40</td></tr> <tr><td colspan="3">R. OVARY</td></tr> <tr><td>Deep Endo</td><td>- 1-3cm</td><td>- 16</td></tr> <tr><td>Dense Adhesions</td><td>- &lt; 1/3</td><td>- 4</td></tr> <tr><td colspan="3">L. TUBE</td></tr> <tr><td>Dense Adhesions</td><td>- &gt; 2/3</td><td>- 16</td></tr> <tr><td colspan="3">L. OVARY</td></tr> <tr><td>Deep Endo</td><td>- 1-3cm</td><td>- 16</td></tr> <tr><td>Dense Adhesions</td><td>- &gt; 2/3</td><td>- 16</td></tr> <tr><td colspan="2">TOTAL POINTS</td><td><u>114</u></td></tr> </table>	PERITONEUM			Deep Endo	- > 3cm	- 6	CULDESAC			Complete Obliteration		- 40	R. OVARY			Deep Endo	- 1-3cm	- 16	Dense Adhesions	- < 1/3	- 4	L. TUBE			Dense Adhesions	- > 2/3	- 16	L. OVARY			Deep Endo	- 1-3cm	- 16	Dense Adhesions	- > 2/3	- 16	TOTAL POINTS		<u>114</u>
PERITONEUM																																																																																																					
Superficial Endo	- > 3cm	- 4																																																																																																			
R. TUBE																																																																																																					
Filmy Adhesions	- < 1/3	- 1																																																																																																			
R. OVARY																																																																																																					
Filmy Adhesions	- < 1/3	- 1																																																																																																			
L. TUBE																																																																																																					
Dense Adhesions	- < 1/3	- 16*																																																																																																			
L. OVARY																																																																																																					
Deep Endo	- < 1 cm	- 4																																																																																																			
Dense Adhesions	- < 1/3	- 4																																																																																																			
TOTAL POINTS		<u>30</u>																																																																																																			
PERITONEUM																																																																																																					
Superficial Endo	- > 3cm	- 4																																																																																																			
L. OVARY																																																																																																					
Deep Endo	- 1-3cm	- 32**																																																																																																			
Dense Adhesions	- < 1/3	- 8**																																																																																																			
L. TUBE																																																																																																					
Dense Adhesions	- < 1/3	- 8**																																																																																																			
TOTAL POINTS		<u>52</u>																																																																																																			
PERITONEUM																																																																																																					
Deep Endo	- > 3cm	- 6																																																																																																			
CULDESAC																																																																																																					
Complete Obliteration		- 40																																																																																																			
R. OVARY																																																																																																					
Deep Endo	- 1-3cm	- 16																																																																																																			
Dense Adhesions	- < 1/3	- 4																																																																																																			
L. TUBE																																																																																																					
Dense Adhesions	- > 2/3	- 16																																																																																																			
L. OVARY																																																																																																					
Deep Endo	- 1-3cm	- 16																																																																																																			
Dense Adhesions	- > 2/3	- 16																																																																																																			
TOTAL POINTS		<u>114</u>																																																																																																			

Determination of the stage or degree of endometrial involvement is based on a weighted point system. Distribution of points has been arbitrarily determined and may require further revision or refinement as knowledge of the disease increases.

To ensure complete evaluation, inspection of the pelvis in a clockwise or counterclockwise fashion is encouraged. Number, size and location of endometrial implants, plaques, endometriomas and/or adhesions are noted. For example, five separate 0.5cm superficial implants on the peritoneum (2.5 cm total) would be assigned 2 points. (The surface of the uterus should be considered peritoneum.) The severity of the endometriosis or adhesions should be assigned the highest score only for peritoneum, ovary, tube or culdesac. For example, a 4cm superficial and a 2cm deep implant of the peritoneum should be given a score of 6 (not 8). A 4cm

deep endometrioma of the ovary associated with more than 3cm of superficial disease should be scored 20 (not 24).

In those patients with only one adenexa, points applied to disease of the remaining tube and ovary should be multiplied by two. \*\*Points assigned may be circled and totaled. Aggregation of points indicates stage of disease (minimal, mild, moderate, or severe).

The presence of endometriosis of the bowel, urinary tract, fallopian tube, vagina, cervix, skin etc., should be documented under "additional endometriosis." Other pathology such as tubal occlusion, leiomyomata, uterine anomaly, etc., should be documented under "associated pathology." All pathology should be depicted as specifically as possible on the sketch of pelvic organs, and means of observation (laparoscopy or laparotomy) should be noted.

## ANEXO IV

**Tabela 12.** Dados clínicos das pacientes selecionadas para a triagem genômica na plataforma *Human CpG Island CHIP-on-Chip Set 244K (Agilent Technologies)*

Caso	Idade	Antecedentes Pessoais	Ciclo menstrual	Dismenorréia	Dor pélvica acíclica	Dispareunia	Esterilidade	Sintoma principal	Medicação	CA125	Dia do ciclo	Estadiamento	Tipo histológico
116	35	Ovário micropolicístico	Irregular	Ausente	Ausente	Profundidade	Não	Dispareunia profundidade	Progesterona VO	33,7	Amenorréia	3	E + MS
121	29	Apendicite	Regular	Incapacitante	Ausente	Profundidade	Não	Dismenorréia	-	0	14	3	I
151	28	-	Irregular	Ausente	Ausente	Ausente	Não	Distensão abdominal	-	0	15	4	E + I
157	38	-	Regular	Severa	Leve	Ausente	Sem tentativa	Dismenorréia	-	0	Amenorréia	4	E + M
169	30	-	Regular	Ausente	Leve	Profundidade	Sem tentativa	Dispareunia e dor ao evacuar	ACO	0	9	3	Não determinada
185	33	-	Regular	Ausente	Ausente	Ausente	Primária	Dor ao evacuar	ACO	11	7	1	E + M
190	36	-	Irregular	Incapacitante	Ausente	Profundidade	Primária	Dismenorréia	Análogo GnRH e ACO	177	22	4	E + M
192	39	tumor ósseo no punho direito (benigno), hipoglicemia, febre reumática	Regular	Incapacitante	Severa	Ausente	Secundária	Dismenorréia	Dimetrose	11,6	Amenorréia	2	E + M
199	28	-	Irregular	Severa	Moderada	Profundidade	Sem tentativa	Dor abdominal	-	70	14	3	E + M
207	39	-	Regular	Incapacitante	Ausente	Ausente	Secundária	Dismenorréia	Endoceptivo	0	Amenorréia	1	Não determinada
214	29	-	Regular	Leve	Ausente	Ausente	Primária	Dor em região escapular direita	ACO	69	14	3	E + M

Tabela 12. continuação

Caso	Idade	Antecedentes Pessoais	Ciclo menstrual	Dismenorréia	Dor pélvica acíclica	Dispareunia	Esterilidade	Sintoma principal	Medicação	CA125	Dia do ciclo	Estadiamento	Tipo histológico
218	58	-	NR	Severa	Incapacitante	Profundidade	Não	-	NR	NR	NR	4	E + M
234	35	-	Regular	Incapacitante	Severa	Profundidade	Primária	Dismenorréia	-	9	9	4	E + I
235	29	-	Regular	Moderada	Leve	Profundidade	Primária	NR	-	0	39	2	E + M
255	34	vasculite	Regular	Moderada	Leve	Profundidade	Não	-	-	0	27	1	E + M
256	32	-	Regular	Ausente	Ausente	Profundidade	Primária	-	Análogo GnRH	0	Amenorréia	4	E + M

VO, via oral; ACO, anticoncepcional; NR, não referido, E, padrão estromal, M, padrão glandular misto, I, padrão glandular indiferenciado

Tabela 13. Dados clínicos das pacientes selecionadas para a análise de MS-AP-PCR.

Caso	Idade	Antecedentes Pessoais	Ciclo menstrual	Dismenorréia	Dor pélvica acíclica	Dispareunia	Esterilidade	Sintoma principal	Medicação	CA125	Dia do ciclo	Estadiamento	Tipo histológico
089	32	Mioma	Regular	Incapacitante	Severa	Profundidade	Primária	Esterilidade	-	0	1	4	E + BD
116	35	Ovário micropolicístico	Irregular	Ausente	Ausente	Profundidade	Não	Dispareunia profundidade	Progesterona VO	33,7	Amenorréia	3	E + M
162	31	-	Regular	Moderada	Ausente	Profundidade	Primária	Dismenorréia	ACO	0	21	3	E + I

VO, via oral; ACO, anticoncepcional, E, padrão estromal, BD, padrão glandular bem diferenciado, M, padrão glandular misto

## ANEXO V

**Tabela 14.** Quantificação dos fragmentos de DNA após a marcação com cianinas e valores da eficiência de incorporação.

			Cianina	pmol/ $\mu$ L de cianina	[ ] ng/ $\mu$ L	Eficiência [%]
DKO	Fração não metilada	Réplica 1	Cy5	3,61	74,13	1,66
HCT116	Fração não metilada	Réplica 2	Cy5	4,0	94,07	1,45
DKO	Fração não metilada	Réplica 2	Cy3	5,18	82,10	2,15
HCT116	Fração não metilada	Réplica 1	Cy3	5,36	91,74	1,99
190 EU	Fração metilada		Cy5	0,39	24,06	0,55
190 EC	Fração metilada		Cy3	0,36	26,85	0,46
190 EU	Fração não metilada		Cy5	0,5	32,95	0,52
190 EC	Fração não metilada		Cy3	0,92	30,88	1,01
116 EC	Fração metilada	Réplica 1	Cy5	2,88	79,45	1,23
		Réplica 2	Cy5	2,05	66,20	1,05
169 EC	Fração metilada	Réplica 1	Cy5	2,67	71,92	1,26
		Réplica 2	Cy5	3,19	84,63	1,28
185 EU	Fração metilada	Réplica 1	Cy5	3,61	57,37	2,14
		Réplica 2	Cy3	4,08	75,35	1,84
190 EC	Fração metilada	Réplica 1	Cy5	2,02	70,10	1,41
		Réplica 2	Cy5	3,12	69,13	1,54
192 EC	Fração metilada	Réplica 1	Cy5	2,64	78,14	1,15
		Réplica 2	Cy5	2,31	72,67	1,08
199 EC	Fração metilada	Réplica 1	Cy5	2,61	67,52	1,31
		Réplica 2	Cy5	2,16	68,56	1,07
207 EC	Fração metilada	Réplica 1	Cy5	1,68	61,43	0,93
		Réplica 2	Cy5	1,70	60,35	0,96
214 EC	Fração metilada	Réplica 1	Cy5	2,24	73,86	1,03
		Réplica 2	Cy5	3,15	71,67	1,49
255 EC	Fração metilada	Réplica 1	Cy5	3,63	71,78	1,71
		Réplica 2	Cy5	3,36	65,59	1,74
256 EC	Fração metilada	Réplica 1	Cy5	1,44	63,16	0,77
		Réplica 2	Cy5	2,11	68,26	1,05
116 EC	Fração não metilada	Réplica 1	Cy5	3,00	64,89	1,57
		Réplica 2	Cy5	2,90	61,82	1,60
185 EU	Fração não metilada	Réplica 1	Cy5	2,85	63,90	1,52
		Réplica 2	Cy3	1,94	71,54	0,92
190 EC	Fração não metilada	Réplica 1	Cy5	2,95	63,91	1,57
		Réplica 2	Cy5	2,50	60,36	1,41
207 EC	Fração não metilada	Réplica 1	Cy5	2,92	61,85	1,60
		Réplica 2	Cy5	2,77	59,29	1,59

Tabela 14. (continuação)

			Cianina	pmol/ $\mu$ L de cianina	[ ] ng/ $\mu$ L	Eficiência [%]
214 EC	Fração não metilada	Réplica 1	Cy5	2,78	69,52	1,36
		Réplica 2	Cy5	2,36	57,40	1,40
255 EC	Fração não metilada	Réplica 1	Cy5	2,44	56,90	1,46
		Réplica 2	Cy5	2,96	69,83	1,44
116 EU	Fração metilada	Réplica 1	Cy3	3,94	79,08	1,69
		Réplica 2	Cy3	2,29	60,59	1,28
169 EU	Fração metilada	Réplica 1	Cy3	4,75	74,35	2,17
		Réplica 2	Cy3	3,96	78,04	1,72
185 EC	Fração metilada	Réplica 1	Cy3	5,38	82,00	2,23
		Réplica 2	Cy5	2,71	71,6	1,29
190 EU	Fração metilada	Réplica 1	Cy3	3,00	67,30	1,52
		Réplica 2	Cy3	5,83	74,45	2,66
192 EU	Fração metilada	Réplica 1	Cy3	1,98	66,99	1,01
		Réplica 2	Cy3	3,33	66,83	1,69
199 EU	Fração metilada	Réplica 1	Cy3	3,31	60,00	1,63
		Réplica 2	Cy3	4,47	75,23	2,02
207 EU	Fração metilada	Réplica 1	Cy3	2,87	76,01	1,28
		Réplica 2	Cy3	4,32	73,37	2,00
214 EU	Fração metilada	Réplica 1	Cy3	2,81	64,70	1,47
		Réplica 2	Cy3	3,75	71,62	1,78
255 EU	Fração metilada	Réplica 1	Cy3	4,81	63,04	2,58
		Réplica 2	Cy3	4,86	65,19	2,54
256 EU	Fração metilada	Réplica 1	Cy3	2,70	62,71	1,46
		Réplica 2	Cy3	4,36	66,52	2,23
116 EU	Fração não metilada	Réplica 1	Cy3	2,12	56,67	1,27
		Réplica 2	Cy3	2,24	62,69	1,22
185 EC	Fração não metilada	Réplica 1	Cy3	4,77	84,97	1,91
		Réplica 2	Cy5	2,71	72,28	1,28
190 EU	Fração não metilada	Réplica 1	Cy3	5,2	74,79	2,36
		Réplica 2	Cy3	4,25	62,18	2,32
207 EU	Fração não metilada	Réplica 1	Cy3	2,43	59,62	1,39
		Réplica 2	Cy3	2,98	67,95	1,49
214 EU	Fração não metilada	Réplica 1	Cy3	2,90	69,05	1,43
		Réplica 2	Cy3	2,74	62,18	1,50
255 EU	Fração não metilada	Réplica 1	Cy3	4,41	73,52	2,04
		Réplica 2	Cy3	4,35	82,48	1,79

EC – endométrio ectópico proveniente de endometriose profunda intestinal; EU – endométrio eutópico

## ANEXO VI

Tabela 15. Parâmetros obtidos após a hibridação usando a marcação do tipo *ULS Labeling System* (*Agilent Technologies*) e valores de referência utilizados na avaliação da qualidade das hibridações.

Parâmetros		<i>DLRSpread</i> **	Fluorescência	<i>BGNoise</i>	<i>Intensidade do sinal</i>	<i>Signal-to-Noise</i>	<i>Reprodutibilidade</i>
Valores de Referência*		<0.3		<15	>90	>20	<0.2
Caso 190		0.37	<i>green</i>	1.48	37.31	25.25	<0.01
Fração não metilada			<i>red</i>	2.05	41.66	20.31	<0.01
HCT116/DKO		0.19**	<i>green</i>	2.53	358.4	141.7	<0.01
Réplica 1			<i>red</i>	3.15	424.3	134.7	<0.01
HCT116/DKO		0.34**	<i>green</i>	2.02	279.2	138.0	<0.01
Réplica 2			<i>red</i>	2.78	322.4	115.8	<0.01
Caso 116	Réplica 1	0.36	<i>green</i>	2.74	204.24	74.49	<0.01
			<i>red</i>	3.00	192.83	64.36	<0.01
	Réplica 2	0.29	<i>green</i>	3.01	177.88	59.10	<0.01
			<i>red</i>	3.90	340.53	87.40	<0.01
Caso 169	Réplica 1	0.38	<i>green</i>	2.57	104.94	40.80	<0.01
			<i>red</i>	3.05	136.60	44.75	<0.01
	Réplica 2	0.30	<i>green</i>	2.97	154.14	51.97	<0.01
			<i>red</i>	3.18	222.87	70.07	<0.01
Caso 185	Réplica 1	0.44	<i>green</i>	2.72	286.38	105.10	<0.01
			<i>red</i>	3.45	432.82	125.55	<0.01
	Réplica 2	0.72	<i>green</i>	2.88	206.55	71.62	<0.01
			<i>red</i>	2.66	32.23	12.11	<0.01
Caso 190	Réplica 1	0.37	<i>green</i>	3.36	143.90	42.79	<0.01
			<i>red</i>	3.53	151.08	42.82	<0.01
	Réplica 2	0.30	<i>green</i>	2.89	170.94	59.23	<0.01
			<i>red</i>	2.99	159.59	53.43	<0.01
Caso 192	Réplica 1	0.47	<i>green</i>	4.12	133.33	32.39	<0.01
			<i>red</i>	2.43	105.11	43.29	<0.01
	Réplica 2	0.27	<i>green</i>	3.04	189.38	62.33	<0.01
			<i>red</i>	3.41	334.41	97.95	<0.01
Caso 199	Réplica 1	0.33	<i>green</i>	5.07	93.73	18.49	<0.01
			<i>red</i>	3.09	108.89	35.22	<0.01
	Réplica 2	0.32	<i>green</i>	3.19	163.20	51.17	<0.01
			<i>red</i>	2.97	159.81	53.74	<0.01
Caso 207	Réplica 1	0.47	<i>green</i>	3.12	96.46	30.89	<0.01
			<i>red</i>	2.64	76.93	29.11	<0.01
	Réplica 2	0.54	<i>green</i>	3.72	75.95	20.42	<0.01
			<i>red</i>	2.35	67.95	28.96	<0.01



Tabela 15. (continuação)

Parâmetros		<i>DLRSpread</i> **	Fluorescência	<i>BGNoise</i>	<i>Intensidade do sinal</i>	<i>Signal-to-Noise</i>	<i>Reprodutibilidade</i>
Valores de Referência*		<0.3		<15	>90	>20	<0.2
<b>Caso 214</b> Fração metilada	Réplica 1	0.36	<i>green</i>	3.97	181.04	45.60	<0.01
			<i>red</i>	3.18	146.36	46.02	<0.01
	Réplica 2	0.23	<i>green</i>	3.38	245.23	72.46	<0.01
			<i>red</i>	3.68	371.50	101.03	<0.01
<b>Caso 255</b> Fração metilada	Réplica 1	0.41	<i>green</i>	2.77	88.62	31.96	<0.01
			<i>red</i>	4.17	82.41	19.78	<0.01
	Réplica 2	0.40	<i>green</i>	3.03	110.12	36.31	<0.01
			<i>red</i>	3.38	99.34	29.40	<0.01
<b>Caso 256</b> Fração metilada	Réplica 1	0.38	<i>green</i>	4.34	167.75	38.70	<0.01
			<i>red</i>	4.80	206.34	43.00	<0.01
	Réplica 2	0.32	<i>green</i>	3.88	278.48	71.77	<0.01
			<i>red</i>	3.80	196.91	51.77	<0.01
<b>Caso 116</b> Fração não metilada	Réplica 1	0.47	<i>green</i>	2.14	58.80	27.49	<0.01
			<i>red</i>	2.50	90.84	36.35	<0.01
	Réplica 2	0.43	<i>green</i>	2.37	57.02	24.03	<0.01
			<i>red</i>	2.68	95.62	35.63	<0.01
<b>Caso 185</b> Fração não metilada	Réplica 1	0.25	<i>green</i>	2.53	321.79	127.12	<0.01
			<i>red</i>	2.63	178.86	68.05	<0.01
	Réplica 2	0.42	<i>green</i>	2.67	117.97	44.19	<0.01
			<i>red</i>	2.95	100.20	33.95	<0.01
<b>Caso 190</b> Fração não metilada	Réplica 1	0.46	<i>green</i>	2.29	79.47	34.70	<0.01
			<i>red</i>	2.95	76.61	25.97	<0.01
	Réplica 2	0.31	<i>green</i>	3.15	97.91	31.11	<0.01
			<i>red</i>	3.45	90.40	26.24	<0.01
<b>Caso 207</b> Fração não metilada	Réplica 1	0.42	<i>green</i>	4.59	70.17	15.29	<0.01
			<i>red</i>	2.68	122.60	45.76	<0.01
	Réplica 2	0.54	<i>green</i>	2.95	70.24	34.20	<0.01
			<i>red</i>	2.31	119.60	51.76	<0.01
<b>Caso 214</b> Fração não metilada	Réplica 1	0.59	<i>green</i>	2.22	77.77	35.10	<0.01
			<i>red</i>	2.50	133.25	53.28	<0.01
	Réplica 2	0.38	<i>green</i>	1.95	64.33	32.97	<0.01
			<i>red</i>	2.42	110.73	45.76	<0.01
<b>Caso 255</b> Fração não metilada	Réplica 1	0.48	<i>green</i>	2.56	93.10	36.39	<0.01
			<i>red</i>	2.66	137.48	51.64	<0.01
	Réplica 2	0.44	<i>green</i>	2.57	121.02	47.07	<0.01
			<i>red</i>	2.97	182.84	61.55	<0.01

\*Para DNA obtidos a partir de amostras de tecidos a fresco; \*\*Para amostras de DNA obtidas de linhagens celulares o valor de *DLRSpread* deve ser <0.2.

## ANEXO VII

**Tabela 16.** Sondas mostrando intensidades de fluorescência significantes, após as normalizações dos sinais, em pelo menos dois casos da fração metilada agrupadas por cromossomo ( $p < 0,001$ ).

Cromossomo	Primary Annotation	Localização	ID	Primary Annotation Type	Normalized Log Ratio	P-value	Casos										
							116	169	190	192	199	207	214	255	256		
chr1	<i>GREM2</i>	chr1:238723369-238723415	A_17_P00900925	ag_LACat   INSIDE	33.446.958	8,75E-06											
					47.991.056	3,22E-21											
	<i>PRDM16</i>	chr1:2987145-2987189	A_17_P00007647	ag_LACat   INSIDE	27.676.451	1,27E-04											
					chr1:3070796-3070840	A_17_P00008268	ag_LACat   INSIDE	4.381.088	5,53E-05								
								chr1:3148171-3148216	A_17_P00008806	ag_LACat   INSIDE	48.139.644	1,44E-13					
	<i>DLGAP3</i>	chr1:35104717-35104761	A_17_P00132593	ag_LACat   INSIDE	35.013.247	8,53E-07											
					46.060.624	8,14E-10											
	<i>DMRTA2</i>	chr1:50653405-50653451	A_17_P00193387	ag_LACat   DOWNSTREAM	39.409.127	2,82E-05											
					chr1:50662779-50662832	A_17_P00193454	ag_LACat   PROMOTER	34.871.855	3,57E-07								
								4.898.897	1,74E-12								
	<i>GFI1</i>	chr1:92718915-92718959	A_17_P15085661	ag_LACat   INSIDE	3.229.966	2,02E-05											
					chr1:92720026-92720081	A_17_P00378162	ag_LACat   INSIDE	39.034.536	1,65E-05								
								chr1:92723893-92723937	A_17_P00378189	ag_LACat   INSIDE	3.915.667	9,51E-07					















