

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

Joana Ladeira Meyer

**Avaliação do padrão de metilação de regiões promotoras dos genes *ESR1*,
ESR2 e *PGR* na endometriose profunda intestinal.**

Botucatu – SP

2011

JOANA LADEIRA MEYER

Avaliação do padrão de metilação de regiões promotoras dos genes *ESR1*, *ESR2* e *PGR* na endometriose profunda intestinal.

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: Profa. Dra. Cláudia Aparecida Rainho

Botucatu
2011

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

Meyer, Joana Ladeira.

Avaliação do padrão de metilação de promotores dos genes *ESR1*, *ESR2* e *PGR* na endometriose profunda intestinal / Joana Ladeira Meyer. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Cláudia Aparecida Rainho

Capes: 20205007

1. Endometriose. 2. Intestinos - Doenças - Aspectos genéticos. 3. Genética humana.

Palavras-chave: Endometriose; Ilha CpG; Metilação do DNA; MS-PCR.

Dedicatória

Aos meus pais Norma e Otávio Marcos, por acreditarem em mim mais do que eu mesma e por não medirem esforços na tentativa de amenizar a saudade que muitas vezes foi difícil de suportar!

Ao Dante, pelo companheirismo inestimável!

Agradecimientos

À Deus pela presença constante em minha vida, por permitir que meus objetivos fossem alcançados e pela força e coragem que muitas vezes eu não sabia de onde vinham.

À Professora Dra. Cláudia Aparecida Rainho pela oportunidade, orientação e ensinamentos. Obrigada por me receber em seu grupo e pela confiança que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Maurício Simões Abrão, do Setor de Endometriose da Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e sua equipe pela colaboração nesta pesquisa

À biomédica Ana Carolina Machado Poppe pela ajuda na coleta das amostras e à médica patologista Annacarolina F.L. Silva pela análise histopatológica das amostras.

Ao patologista Alexandre Fabro pela delimitação das lesões endometrióticas e pela ajuda no desenvolvimento do protocolo de macrodissecção manual.

Ao professor Dr. Robson F. Carvalho e à professora Dra. Renee L. Amorim pelas correções e sugestões da primeira versão desta dissertação.

Aos colegas de Pós-graduação, aos professores e aos funcionários do Departamento de Genética e Seção de Pós-Graduação, pelo convívio agradável durante esse tempo.

À Comissão Examinadora, pela disponibilidade e pelas sugestões, comentários e críticas que com toda certeza em muito contribuirão para o enriquecimento desse trabalho.

Às pacientes que aceitaram fazer parte desse estudo mesmo sabendo que não receberiam benefícios imediatos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa e auxílio financeiro concedidos.

Agradecimentos especiais

Aos meus pais, com quem sempre pude contar em todos os momentos. Obrigada por participarem tão intensamente da minha vida, me dando liberdade e apoio nas minhas escolhas. Levo comigo tudo que vocês me ensinaram e em tudo que faço penso em retribuir o amor, a atenção e a paciência que vocês dedicaram a mim.

Ao Dante, maior incentivador para o começo e conclusão desse trabalho. Você foi o conforto nas horas difíceis e sem você esse percurso teria sido árduo demais. Obrigada por ter estado ao meu lado, tornando os momentos difíceis mais fáceis. Tudo com você torna-se melhor. Te amo!

Ao meu irmão Tiago pelo carisma e alegria que contagiam mesmo de tão longe. E ao meu irmão Gabriel por ser um exemplo de competência.

Às amigas de laboratório, Dani, Érika, Priscila e Mariana, pela ajuda, incentivo e companheirismo. Obrigada por tornarem o ambiente de trabalho sempre agradável.

À Tereza Antonangelo e sua família, por terem me recebido com tanto carinho em sua casa. Muito Obrigada.

Às companheiras de república, Aline e Luciana por terem suportado minhas lamúrias tantas vezes e por terem sido grandes amigas em todos os momentos. Aprendi muito com vocês e sempre me lembrarei dos incontáveis bons momentos que dividimos.

À Juliana Pomari, grande amiga e confidente. Obrigada pelo apoio e disposição em ajudar.

À Tamara e Jaqueline pelos momentos divertidos que passamos juntas.

Aos amigos de Indaiatuba, Jan, Renata e Sérgio por tornarem os finais de semana mais alegres.

Às amigas de Santos Dumont que mesmo distantes sempre estiveram presentes, demonstrando carinho, apoio e saudades, em especial Carol, Lillian e Renata.

Lista de Abreviaturas

ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
CA125	<i>Cancer-antigen 125</i>
<i>CYP19A1</i>	<i>Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 gene</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA metiltransferase
E2	Estradiol
ER	Receptor de estrógeno alfa
ER	Receptor de estrógeno beta
<i>ESR1</i>	<i>Estrogen Receptor 1 gene</i>
<i>ESR2</i>	<i>Estrogen Receptor 2 gene</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>
<i>HOXA10</i>	<i>Homeobox A cluster gene</i>
HRE	Elemento Responsivo Hormonal
<i>IL-1</i>	<i>Interleukin 1</i>
Kb	Kilobase
<i>MBL</i>	<i>Methyl-CpG binding domain</i>
<i>MeCP2</i>	<i>Methyl CpG binding protein 2</i>
<i>MLH1</i>	<i>mutL homolog 1</i>
MSP	<i>Methylation Specific Polymerase Chain Reaction</i>
<i>NR5A1</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 5 gene</i>
<i>PGE₂</i>	<i>Prostaglandina E₂</i>
<i>PGK</i>	<i>Receptor Progesterone</i>
<i>PGRA</i>	Receptor Progesterone isoform A
<i>PGRE</i>	Receptor Progesterone isoform B
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
SAM	S-adenosil-L-metionina
RT-PCR	Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction
<i>SF1</i>	<i>Steroidogenic Factor 1 gene</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
<i>TP16</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A gene</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
5'UTR	<i>5' untranslated region</i>
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

Introdução	15
Conceitos em Epigenética.....	16
Endometriose.....	29
Tipos de Endometriose.....	24
Etiologia da Endometriose.....	26
Epigenética e Endometriose.....	28
Receptores Nucleares.....	30
Alterações Hormonais na Endometriose.....	33
Objetivos	37
Objetivo Geral.....	38
Objetivos Específicos.....	38
Referências Bibliográficas	39
Artigo	46
Conclusões	65
Anexos	67
Anexo I	68
Anexo II	69
Apêndices	74
Apêndice I	75
A - Avaliação preliminar <i>in silico</i>	75
B - Padronização da técnica de MSP.....	77
Apêndice II – Resultados detalhados da análise de MSP	81
Referências Bibliográficas	85

Resumo

A endometriose é uma doença inflamatória estrógeno-dependente que afeta de 5 a 10% das mulheres em idade reprodutiva. É caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina e está associada à dismenorreia, dor pélvica e infertilidade. Os níveis de expressão dos receptores nucleares SF1 (fator esteroidogênico 1), estrógeno e progesterona estão alterados no tecido endometriótico comparado ao endométrio normal. Estudos prévios relataram que os genes codificadores dos receptores dos hormônios esteróides *ESR1* (receptor de estrógeno 1), *ESR2* (receptor de estrógeno 2) e progesterona (*PGR*) apresentam promotores alternativos que são modulados epigeneticamente por alterações na metilação do DNA, que ocorre preferencialmente nas ilhas CpG presentes nestas regiões. Em células endometriais normais foi observada uma associação entre a presença de metilação e ausência de expressão dos genes *SF1* e *ESR2* (receptor de estrógeno) enquanto a perda da metilação foi correlacionada com níveis aumentados de expressão gênica na endometriose peritoneal e ovariana. Com base nestas evidências, o presente trabalho investigou o padrão de metilação dos genes *PGR* (promotores A e B), *ESR1* (promotores A e B) e uma região intragênica ao *ESR2*. O promotor B do gene *PGR* e a ilha CpG localizada na 5'UTR do gene *ESR2* foram avaliadas em 44 amostras de endometriose profunda intestinal pela técnica de MSP (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*). Em sete destas, também foi possível a investigação na amostra pareada de endométrio eutópico. O padrão de metilação dos promotores A e B do gene *ESR1* e o promotor A do gene *PGR* foi investigado em 37 amostras de endometriose. A abordagem de MSP consiste na modificação do DNA pelo bissulfato de sódio, que converte citosinas não metiladas em uracila. Posteriormente, a região de interesse foi amplificada pela PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para alelos metilados e não metilados. O padrão de metilação foi analisado com base na presença e/ou ausência do produto detectado após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e coloração com nitrato de prata. Todas as amostras mostraram a presença de alelos metilados e não metilados para os genes *ESR1* e *ESR2*. Para o promotor A do gene *PGR*, 19% (7/37) das amostras apresentaram-se hipermetiladas, enquanto que para o promotor B a metilação foi detectada em 39% (17/44) das amostras. A análise comparativa conduzida em sete amostras pareadas de endométrio eutópico e ectópico provenientes da mesma paciente revelou que o ganho de metilação na região promotora do gene *PGR*, isoforma B, estava restrito ao endométrio ectópico (4/7 amostras). Estes dados estão de acordo com um único relato da literatura e sugerem que a metilação aberrante do promotor B do gene *PGR* é uma marca epigenética específica das lesões endometrióticas. Pesquisas futuras devem investigar a relação entre a hipermetilação do gene *PGR* e a resistência a progesterona, bem como o uso potencial desses padrões anormais de metilação do DNA como biomarcadores diagnósticos nesta doença complexa.

Abstract

Endometriosis is an estrogen-dependent inflammatory disease which affects 5 to 10% of women of reproductive age. This disease is characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity and is associated with dysmenorrhea, pelvic pain, and infertility. Abnormal expression levels of SF1 (steroidogenic factor 1), estrogen and progesterone nuclear receptors were detected in the endometriotic tissue compared to the normal endometrium. Previous studies have reported that genes encoding the steroid hormone receptors *ESR1* (estrogen receptor 1), *ESR2* (estrogen receptor 2) and progesterone (*PGR*) are characterized by alternative promoters epigenetically regulated by DNA methylation at CpG islands co-localized in these regions. In normal endometrial cells, it was observed an association between DNA methylation and absence of expression of the genes *SF1* and *ESR2* (estrogen receptor), while loss of DNA methylation was correlated with increased expression levels of these genes in peritoneal and ovarian endometriosis. Based on these findings, this study investigated the methylation pattern of the *PGR* (promoters A and B), *ESR1* (promoters A and B) genes and an intragenic region of the gene *ESR2*. The promoter B of *PGR* gene and the CpG island mapped at 5'UTR of the *ESR2* gene were evaluated in 44 samples of intestinal deep endometriosis by MSP (methylation-specific polymerase chain reaction). In seven cases, paired samples of eutopic endometrium from the same patients were also evaluated, the methylation patterns of the *ESR1* gene (promoters A and B) and the promoter region A of the *PGR* gene were investigated in 37 samples of endometriosis. The MSP method is based on the DNA modification by sodium bisulfite, which converts unmethylated cytosines to uracil. Subsequently, the target region is amplified by PCR employing specific primer pairs to detected methylated or unmethylated alleles. The methylation pattern was defined based on the presence and/or absence of the PCR product observed after electrophoresis on 6% polyacrylamide gel and silver nitrate staining. All samples showed the presence of methylated and unmethylated alleles for the *ESR1* and *ESR2* genes. A total of 19% (7/37) of the samples were hypermethylated in the promoter A of *PGR* gene, while 39% (17/44) of them samples were methylated in the promoter region B. The comparative analysis conducted in seven paired samples of eutopic endometrium and endometriotic lesions from the same patient revealed that the gains of DNA methylation in the promoter region B of the *PGR* gene were restricted to the ectopic endometrium (4/7 samples). These data are in accordance with previously reported data and suggest that aberrant methylation of the *PGRB* promoter is a specific epigenetic mark of endometriotic lesions. Future research should investigate the relationship between *PGR* hypermethylation and progesterone resistance, as well the potential for the use of abnormal patterns of DNA methylation as prognostic biomarkers in this complex disease.

Introdução

Conceitos em Epigenética

O termo epigenética é utilizado para definir a herança dos padrões de expressão gênica, sejam elas mitóticas ou meióticas, que não são determinados pelas mudanças na sequência do DNA (Egger et al, 2004). É considerado um processo herdável, por ser transmitido de forma estável após sucessivos ciclos de divisão celular e reversível, por não alterar a sequência do DNA. Os principais mecanismos epigenéticos incluem a metilação do DNA, as modificações covalentes pós-traducionais das histonas e o silenciamento mediado por RNA. Estes diferentes mecanismos estão intimamente ligados e, muitas vezes, agem conjuntamente como uma forma de regular os diferentes processos celulares (Vaissière et al, 2008).

A metilação do DNA é a modificação epigenética mais estudada e melhor caracterizada até o momento atuando de forma indispensável no silenciamento e regulação gênica, especialmente no *imprinting* genômico, na inativação do cromossomo X e no silenciamento de transposons (Bird, 2002). Essa modificação epigenética consiste na adição covalente de um grupo metil no carbono 5 da citosina seguida por uma guanina no dinucleotídeo CpG (Vaissière et al, 2008; Handel et al, 2010). Aproximadamente 60-70% dos sítios CpG estão metilados no genoma de mamíferos. Isto inclui diversos tipos de sequências: genes de cópia única, sequências intergênicas bem como elementos repetitivos. As exceções compreendem regiões caracterizadas por alta densidade de CpG (Ilhas CpG) e que estão localizadas principalmente nos promotores e exóons de genes *housekeeping* (Rottach et al, 2009).

Ilhas CpG estão presentes em aproximadamente 60-70% dos genes humanos e 40% daqueles que mostram um perfil de expressão tecido-específico apresentam ilhas CpGs associadas com suas regiões promotoras (Illingworth e Bird, 2009).

Alguns autores tem proposto definições específicas para ilhas CpG baseadas nas características de suas sequências. O critério original define ilhas CpG como regiões de pelo menos 200 pares de base (pb), com conteúdo de CG maior do que 50% e razão entre sítios CpG observados/esperados superior a 0,6 (Gardiner-Garden e Frommer, 1987). No entanto, visando tornar os critérios mais restritivos no que se refere à definição de ilhas CpG associadas a promotores gênicos e sua relevância no processo de transcrição Takai e Jones (2002) estabeleceram que uma ilha CpG deve ser um fragmento maior de 500pb, com conteúdo de CG maior do que 55% e com razão entre os sítios observados/esperados superior a 0,65. Assim, nessa nova definição os elementos repetitivos foram excluídos.

Como a metilação do DNA é uma modificação química reversível da molécula do DNA, a manutenção e a precisa transmissão dos padrões de metilação para as células filhas são processos essenciais durante o ciclo celular. As enzimas responsáveis pela metilação do DNA nos dinucleotídeos CpG são membros de uma família de proteínas chamadas DNA metiltransferases (DNMT). Estas enzimas estabelecem e mantêm os padrões de metilação do genoma e utilizam a S-adenosil-L-metionina (SAM) como doador de grupos metil (Espada & Esteller, 2010).

Cinco membros da família das DNA metiltransferases foram identificados em mamíferos: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L. DNMT1 é a

mais abundante em células somáticas, têm uma forte preferência por DNA hemimetilado atuando, portanto, na forquilha de replicação durante a fase S do ciclo celular. Sendo assim, presume-se que a DNMT1 é a principal enzima responsável pela cópia e manutenção dos 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 eventos 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 (Bestor, 2000; Espada & Esteller, 2010).

Embora esteja bem estabelecido que a consequência predominante da metilação seja a repressão da transcrição, ainda não está claro se a inibição ocorre direta ou indiretamente. A inibição direta da transcrição pode ocorrer através do bloqueio da ligação dos fatores de transcrição ao promotor contendo CpG metilado. Já a repressão indireta pode envolver proteínas como MeCP2 (methyl CpG binding protein 2) que especificamente se ligam ao DNA metilado através de um domínio de ligação a metil-CpG (MBD). Proteínas contendo este domínio MBD mediam a repressão da transcrição recrutando desacetilases de histonas, resultando em uma estrutura repressiva da cromatina (Bird, 2002).

A alteração dos padrões de metilação é frequentemente relatada em muitas doenças humanas, incluindo o câncer. A hipometilação global do DNA e a hipermetilação de promotores são comumente observadas em tumores em

estágio inicial. Isto sugere que as alterações epigenéticas são eventos precoces na perda da homeostase celular, podendo preceder alterações genéticas (Esteller, 2007).

Endometriose

A endometriose é uma doença ginecológica benigna descrita pela primeira vez por Rokitansky em 1860 (*apud*, Bianchi et al, 2007). É uma condição crônica caracterizada pelo crescimento de tecido endometrial (glândula e estroma) fora da cavidade uterina (Kitawaki et al, 2002). Os sítios mais prevalentes dos implantes endometrióticos localizam-se na cavidade pélvica, incluindo ovários, tubas uterinas, ligamentos uterossacros e septo retovaginal (Farquhar, 2007). Estas lesões também podem ser encontradas, menos frequentemente, na parede do reto, bexiga e intestino. A localização em sítios distantes do trato reprodutivo é rara, mas há relatos da presença destas lesões no sistema pulmonar, pericárdio e cérebro (Giudice & Kao, 2004).

Os sintomas da endometriose incluem dor pélvica crônica, dismenorréia (dor pélvica durante a menstruação), irregularidade dos ciclos menstruais, dispareunia (dor durante a relação sexual) e infertilidade. Constitui-se um problema de saúde pública com impacto na qualidade de vida das mulheres afetadas, podendo levar a longos períodos de internação e afastamento social e profissional, além de gastos excessivamente altos com medicamentos tendo, portanto, um impacto econômico mundial (Eskenazi & Warner, 1997; Rizner, 2009).

Essa doença acomete de 6 a 10% das mulheres em idade reprodutiva, sendo que a prevalência em mulheres assintomáticas varia de 2 a 50%; em mulheres que apresentam dismenorréia a prevalência aumenta para 40 a 60%, e é de 20 a 30% para aquelas com infertilidade (Farquhar, 2007).

Diversos fatores predisõem ao desenvolvimento da endometriose, sendo os mais frequentes: menarca precoce (Cramer et al, 1986; Signorello et al, 1997; Moen et al, 1997); ciclos menstruais curtos e intensos (Cramer et al, 1986; Sangi-Haghpeykar & Poindexter, 1995; Matorras et al, 1995), nuliparidade (Sangi-Haghpeykar & Poindexter, 1995) e história familiar (Simpson et al, 1980; Hadfield et al, 1997).

Do ponto de vista fisiopatológico, a presença de focos endometriais ectópicos está associada a alterações anatômicas, endócrinas, imunológicas e inflamatórias no peritônio pélvico, o que causa liberação de prostaglandinas e possibilita o aparecimento de aderências com diferentes graus de distorções anatômicas. Assim, a presença de tais focos pode causar o binômio dor e infertilidade nas portadoras da doença (Crosera et al, 2010). Pode envolver, também, mecanismos que são independentes de alterações anatômicas como observado pelo aumento da frequência de endometriose em mulheres que expuseram o útero a toxinas ambientais ou estrógenos potentes como o dietilbestrol (Bulum, 2009).

Mecanismos que associam a endometriose com a infertilidade têm sido sugeridos, como: (1) distorção da anatomia pélvica devido a adesões endometrióticas, que poderiam prejudicar a liberação do oócito ou inibir seu transporte; (2) função peritoneal alterada devido ao aumento do volume de fluido peritoneal e aumento da concentração de macrófagos ativados,

prostaglandinas, interleucina 1 (IL-1), TNF (*tumor necrosis factor*) e proteases. Estas alterações causariam alguns efeitos adversos no oócito, espermatozóide e embrião (Birmingham, 2006) como falha de implantação devido à redução da expressão endometrial de integrinas (Lessey et al, 1994) e L-selectina na fase de implantação (Genbacev et al, 2003).

Apesar dos avanços na compreensão da doença, a endometriose permanece significativamente pouco diagnosticada. Seu diagnóstico é baseado inicialmente na história clínica da paciente. Entretanto a sintomatologia variada e sua pobre correlação com a severidade da doença podem dificultar o diagnóstico (Vercellini et al, 1991). Sendo assim, o diagnóstico final é dado pela análise histopatológica após laparoscopia, e o estadiamento é baseado seguindo os critérios estabelecidos pela *American Society for Reproductive Medicine (ASRM, 1997)* (Brosens et al, 2004).

Segundo a *ASRM* a endometriose é classificada em quatro estadiamentos: forma mínima (estadio I), leve (II), moderada (III) e severa (IV) com base em critérios como diâmetro, localização, aparência e quantidades de lesões, processos aderenciais, tempo de recorrência, taxa de efeitos adversos ao tratamento, predição sobre probabilidade de gravidez, facilidade da intervenção cirúrgica (classificada como fácil, moderada, difícil ou muito difícil), entre outros.

Abrão et al, (2003) propuseram uma classificação histológica das lesões endometrióticas de acordo com o grau de diferenciação do epitélio glandular e quanto à presença de estroma em quatro subtipos:

- Padrão estromal – presença de estroma morfológicamente similar ao do endométrio eutópico em qualquer fase do ciclo;

- Padrão glandular – presença de epitélio superficial ou constituindo espaços glandulares ou císticos, associado a estroma e/ou sinais de hemorragia prévia, caracterizada pela presença de hemossiderófagos, fibrose e angiogênese. Este padrão é ainda subclassificado segundo a similaridade com o epitélio endometrial eutópico nas seguintes formas:
 - Bem diferenciado – células epiteliais têm morfologia indistinguível do endométrio eutópico nas diferentes fases do ciclo;
 - Indiferenciado – composto por células epiteliais não endometrióides, podendo apresentar-se como epitélio aplainado ou cuboidal baixo, assemelhando-se ao mesotélio do revestimento peritoneal, ou com epitélio Mülleriano distinto do endometrióide, como seroso ou mucinoso
 - Diferenciação mista – presença, na mesma localização, de padrões glandulares diferenciados e indiferenciados.

Segundo os autores (Abrão et al, 2003) o padrão glandular indiferenciado foi mais frequentemente associado aos estágios III e IV e em relação a dor, as pacientes que apresentaram padrão bem diferenciado ou estromal responderam melhor ao tratamento terapêutico. Adicionalmente, Kamergorodsky et al, (2009) avaliaram a correlação entre o padrão de diferenciação histológica e o grau de infiltração da lesão. Os autores demonstraram que as lesões endometrióticas com padrão indiferenciado apresentam características mais invasivas.

Exames complementares à laparoscopia como exame ginecológico, ultrassonografia transvaginal e ressonância magnética podem auxiliar no

diagnóstico de endometriose. Segundo Abrão et al. (2007) a ultrassonografia transvaginal se mostrou sensível na detecção de 98% das lesões localizadas na região retossigmóide e 95% das lesões na doença retrocervical. No que se refere à ressonância magnética, este método diagnóstico mostrou 83% de sensibilidade na detecção da endometriose retossigmóide e 76% para retrocervical.

Segundo Farquhar (2007), embora as concentrações séricas de CA125 (*Cancer antigen 125*) possam estar levemente aumentadas em mulheres com endometriose, a dosagem sorológica desse antígeno não é considerada útil no estabelecimento do diagnóstico. Contrariamente, Patrelli et al. (2011) demonstraram que nos casos de endometriose classificadas como moderadas e graves, os níveis de CA125 foram significativamente elevados, e assim a correlação entre este marcador e o achado cirúrgico e anatomopatológico de endometriose ovariana e profunda foi considerado estatisticamente significativo. Entretanto, a laparoscopia permanece como o método diagnóstico mais confiável (Rosa & Silva, 2007).

No que se refere ao tratamento clínico vários são os medicamentos e esquemas terapêuticos utilizados, incluindo contraceptivos orais, progestágenos, agentes androgênicos e agonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (Farquhar, 2007). A maioria baseia-se no fato de o tecido endometrial ser receptivo e dependente do estrogênio, criando assim, um ambiente hipoestrogênico que leva à interrupção do ciclo de estimulação, possibilitando, muitas vezes, a regressão dos implantes endometriais. No entanto, até o momento, não existem evidências de que o tratamento hormonal para endometriose associada à infertilidade promova efeitos benéficos e,

menos ainda, de que aumente a taxa de gravidez. Dessa forma, sua grande importância se dá no tratamento da dor pélvica (Crosera et al, 2010). Segundo Mahhute & Arici (2003), a recorrência da dor pélvica é detectada em 30 a 70% das mulheres, num período que compreende de seis a dezoito meses após a interrupção do tratamento hormonal. Dessa forma, o tratamento cirúrgico permanece o método de escolha. Este visa a remoção completa dos implantes endometriais e aderências dos órgãos envolvidos no sentido de restabelecer a anatomia normal da pelve (Crosera et al, 2010), mas, em 24% das pacientes existe a probabilidade de recorrência da dor três anos após a cirurgia (Mahhute & Arici, 2003).

Tipos de endometriose

São observadas diferentes formas das lesões endometrióticas. Ao microscópico, todas essas lesões pertencem a uma única entidade, ou seja, glândulas endometriais e estroma de localização extra-uterina; macroscopicamente, porém, a endometriose pélvica pode ser subdividida em três tipos diferentes: endometriose peritoneal superficial, endometriose ovariana e endometriose profunda. Dessa forma, pode-se supor que dependendo do tipo macroscópico da lesão, os sintomas dolorosos irão variar (Fauconnier & Chapron, 2005).

A doença peritoneal se caracteriza pela presença de implantes superficiais no peritônio; a ovariana inclui os implantes superficiais de ovário e os cistos típicos da doença, os endometriomas. A endometriose profunda é caracterizada pela presença de lesões que penetram 5mm ou mais na superfície

peritoneal e acomete as regiões retro-cervical e para-cervical, o septo reto-vaginal, o retossigmóide, os ureteres e a bexiga. Além disso é subdividida em três tipos diferentes de lesão: as lesões do tipo I são cônicas, com base voltada para a cavidade peritoneal, o que indica uma provável patogenia infiltrativa; as lesões do tipo II são caracterizadas por grandes distorções da anatomia pélvica devido a aderências de alças intestinais grandes e grosseiras cobrindo a lesão e as lesões do tipo III são caracterizadas por uma maior área profunda de lesão endurecida recoberta por peritônio normal ou com pequenas lesões pigmentadas de adenomiose externamente (Cornillie et al, 1990; Koninckx & Martin 1992; Koninckx et al, 1994; Kamergorodsky et al, 2009).

A frequência da endometriose intestinal varia amplamente, de 3,7 a 35% dos casos (Remorgida et al., 2007). A sub-localização da endometriose intestinal é geralmente em nível do retossigmóide, no entanto, múltiplos nódulos podem ser encontrados, geralmente no ceco e no íleo distal. Nestes casos, a endometriose pode causar obstrução intestinal ou intussuscepção devido à estenose da válvula ileocecal e requerem cirurgia de emergência (Indraccolo et al, 2010).

Adicionalmente, o diagnóstico clínico e cirúrgico é complexo, sendo os nódulos endometrióticos da parede intestinal de difícil visualização por exames de imagem, devido principalmente aos níveis de mobilidade da região (Kinkel et al, 2006). Os principais sintomas são dores pélvicas, constipação e/ou diarreia recorrentes, flatulência, distensão abdominal e tenesmo. Nos casos em que há acometimento da mucosa ou submucosa intestinal ocorre hematoquezia (hemorragia) periódica de intensidade variável, principalmente acompanhando

o período menstrual, mas às vezes ocorre sangramento anal isolado (Garcia et al, 2006).

Etiologia da Endometriose

A endometriose ainda possui etiologia incerta, mas diversos estudos demonstraram que esta doença é resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais, caracterizando-a como uma doença complexa. Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos permanecem pouco conhecidos, mas sabe-se que a endometriose pode ser herdada de forma poligênica e que sua incidência em familiares de mulheres afetadas é até sete vezes maior que a incidência em mulheres sem história familiar. Há ainda indícios de ligação com os cromossomos 7 e 10, no entanto, nenhum gene relevante nessa região foi identificado até o momento (Bulum, 2009). A análise de fatores genéticos baseada em ligação e estudos com gêmeos indicaram genes candidatos com potencial biológico plausível. Muitos destes estudos apontaram anormalidades nas enzimas de detoxificação, as quais poderiam aumentar a suscetibilidade a estímulos ambientais. Também estão incluídos genes associados com transformação maligna (supressores de tumor, por exemplo) (Giudice & Kao, 2004).

A origem dos implantes endometrióticos e a patogênese da endometriose têm sido uma área de ativa investigação. Embora isoladamente nenhuma teoria ou hipótese possa explicar todos os casos de endometriose, a teoria da menstruação retrógrada ou implantação metastática é a de maior aceitação. Segundo ela, descrita por Sampson, em 1927, o tecido endometrial

viável reflui através da tuba uterina durante a menstruação, implantando-se na superfície peritoneal ou em outros órgãos pélvicos. Segundo Giudice & Kao (2004) esta teoria é apoiada por achados nos quais mulheres com endometriose apresentavam grandes volumes de refluxo menstrual em relação ao grupo controle sadio. No entanto, considerando-se que a menstruação retrógrada ocorre em 76 a 90% das mulheres, que células endometriais viáveis são detectadas no fluido peritoneal (Kruitwagenn et al, 1991) e, sendo a prevalência da doença muito inferior a estes números, acredita-se que existem outros mecanismos envolvidos na viabilidade dos implantes, como fatores imunológicos, angiogênicos e genéticos (Seli et al, 2003).

A teoria da metaplasia celômica (descrita em 1919 por Meyer) propõe que a endometriose poderia se desenvolver pela metaplasia das células que revestem o peritônio abdominal e visceral resultando em implantes endometriais. A teoria da metástase linfovascular sugere que células endometriais poderiam se disseminar por via linfática e hematogênica, propagando-se em locais distantes da pelve, sendo esta apoiada pela presença de tecido endometrial na vasculatura uterina de pacientes com adenomiose. Uma quarta teoria baseia-se na capacidade de ocorrência de metaplasia nos tecidos derivados dos ductos de Müller, sugerida após o aparecimento de alguns casos de endometriose em homens, ou mulheres com anomalias genitais que não apresentam menstruação retrógrada, casos estes incapazes de serem explicados pela da teoria da implantação (Meyer, 1919; Koninckx et al, 1999). Esta última teoria é apoiada também pela observação experimental de que restos menstruais ou fragmentos de endométrio autólogos transplantados poderiam induzir metaplasia endometrial ou endometriose em

diferentes tecidos (Merril, 1966). Por fim, uma última hipótese se refere às células-tronco circulantes oriundas da medula óssea, as quais favoreceriam o desenvolvimento de células endometriais em locais extra-uterinos (Sasson & Taylor, 2008). Segundo Figueira et al, (2011) células-tronco progenitoras adultas podem ser responsáveis pela grande capacidade regenerativa do endométrio. Sendo assim essas células podem ser capazes de gerar tecido endometrial fora da cavidade uterina quando derramadas na cavidade pélvica por refluxo do conteúdo menstrual. Além disso, células tronco mesenquimais também podem estar envolvidas na patogênese da endometriose e pode ser a principal fonte de endometriose fora da cavidade pélvica.

Epigenética e Endometriose

Recentemente alguns estudos têm sugerido o envolvimento de alterações epigenéticas na etiopatogenia da endometriose. Martini e colaboradores (2002), pela análise de MSP (*Methylation Specific Polymerase Chain Reaction*) em 46 amostras de endometriose, relataram a hipermetilação do gene *MLH1* (*mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2*) em 8,6% dos casos e apenas um caso (2,17%) apresentou hipermetilação do gene *TP16* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A). Dos 46 casos, dois eram classificados como grau IV e ambos os pacientes mostravam coexistência de endometriose e carcinoma de endométrio. Os autores sugeriram que a expressão reduzida deste gene pode estar envolvida com a evolução maligna da endometriose. Wu et al (2005), demonstraram que níveis menores de expressão do gene *HOXA10* (*homeobox A10*) poderiam ser explicados pela hipermetilação da sua

região promotora na endometriose. Este gene encontra-se expresso no endométrio e age regulando os níveis de estrógeno e progesterona.

Progestinas têm sido amplamente utilizadas no tratamento da endometriose, no entanto, nove por cento das mulheres não respondem ao tratamento. Considerando estes fatos Wu et al (2006) buscaram esclarecer as razões da resistência à progesterona e demonstraram que a região promotora do gene *PGR*, especificamente a isoforma B está hipermetilada na endometriose quando comparada aos controles. Adicionalmente a expressão de *PGRB* foi consideravelmente reduzida no endométrio ectópico. Dessa forma, os autores sugeriram que a resistência à progesterona na endometriose, em geral, é devida a hipermetilação do promotor de *PGR*.

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* foi associada aos baixos níveis de expressão deste receptor no endométrio normal e a perda de metilação foi correlacionada com os níveis elevados de expressão na endometriose. Cavallini et al. (2011) também observaram níveis aumentados de expressão de *ESR2* na endometriose mas não no endométrio eutópico, e esses achados foram associados a baixos níveis de expressão de *ESR1* na endometriose.

Xue et al. (2007b) também demonstraram que o gene *SF1* (*steroidogenic factor 1*), codificador de um fator de transcrição essencial para a ativação da biossíntese de estrógeno, é indetectável em estroma endometrial

normal e altamente expresso em estroma endometriótico, devido a hipometilação de sua região promotora.

A principal evidência para o envolvimento das alterações epigenéticas na endometriose, no entanto, foi dada pelos padrões de expressão anormais das DNA metiltransferases. Wu et al. (2007) estudaram o padrão de expressão das DNA metiltransferases 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. Estes achados reforçam o envolvimento de padrões anormais de metilação do DNA na patogênese desta condição.

1.4 Receptores nucleares

Receptores nucleares estão amplamente envolvidos no controle de diversos processos fisiológicos e representam alvos terapêuticos para um grande número de doenças humanas incluindo câncer, doenças cardíacas e distúrbios endócrinos e metabólicos. A superfamília dos receptores nucleares inclui os receptores para esteróides, vitamina D, retinóides, hormônios tireoidianos e prostaglandinas, além de um grande número de receptores cujos ligantes permanecem não identificados, denominados “receptores órfãos” (Gronemeyer & Gustafsson et al, 2004).

Os membros da superfamília dos receptores nucleares são fatores transcricionais que controlam vias essenciais do desenvolvimento e da fisiologia celular. Eles possuem estrutura modular e sua ligação ao DNA se faz

como monômeros ou dímeros através do módulo ligante ao DNA, o qual se liga a sequências nucleotídicas específicas, conhecidas como elementos responsivos hormonais (HREs) (Barra & Velasco, 2004).

Os genes que codificam os receptores de estrógeno alfa (*ESR1* – *estrogen receptor 1*) e beta (*ESR2* – *estrogen receptor 2*) são membros de uma superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição e estão localizados respectivamente em 6q25.1 e 14q23.2. O gene *ESR1*, o primeiro receptor de estrógeno clonado, foi isolado a partir da linhagem MCF-7 de câncer de mama; o gene *ESR2* foi clonado a partir de próstata de ratos e de testículos humanos (Bulun et al, 2005).

O gene *ESR1* é regulado via múltiplos promotores, sendo A, B, e C usados alternativamente em diferentes tecidos. Os promotores A e B estão localizados dentro de uma região de 2Kb *upstream* ao sítio de início da tradução, enquanto o promotor C localiza-se a 101kb *upstream* a este sítio. Os transcritos resultantes dos promotores A e B diferem apenas na região 5'UTR e codificam a mesma proteína. O gene *ESR2* também é regulado por múltiplos promotores que geram, por *splicing* alternativo, diversos RNAm (Trukhacheva et al, 2009).

Os receptores ER alfa e ER beta compartilham a mesma estrutura de seus domínios, que são designados de A a F. O domínio de ligação C é o mais conservado, apresentando 96% de identidade entre os dois genes, permitindo que ambos os receptores se liguem a sítios similares (Pearce & Jordan, 2004).

O gene *PGR* (*progesterone receptor*) codifica um membro da superfamília de receptores esteroidais. Sua proteína media os efeitos fisiológicos da progesterona, que possui papel fundamental na reprodução e

nos eventos relacionados ao estabelecimento e manutenção da gravidez. Este gene utiliza dois promotores distintos e diferentes sítios de início da tradução no primeiro éxon para produzir as duas isoformas, A e B. As duas isoformas são idênticas, exceto pela adição de 165 aminoácidos na cauda N-terminal da isoforma B. A relação de cada isoforma varia nos tecidos reprodutivos em consequência do desenvolvimento e *status* hormonal e durante a carcinogênese (Conneely et al, 2002).

Diversos pesquisadores relataram níveis significativamente mais altos de ER beta e menores de ER alfa em tecidos endometrióticos quando comparados com o endométrio normal. Além disso, os níveis de ambas as isoformas do receptor da progesterona, especialmente a B (PGRB), são significativamente menores nos tecidos endometrióticos (Attia et al, 2000; Bulum et al, 2006).

Vouk et al, (2011), identificaram 78 genes diferencialmente expressos na endometriose ovariana pela análise de expressão gênica baseada em um micro arranjo de baixa densidade contendo 172 genes (152 genes foram selecionados no *GeneLogic database*, utilizando como referência os estudos de expressão gênica em larga escala em endometriose ovariana, e 20 genes adicionais relacionados com o metabolismo e ação do estrógeno. Cinco genes diferencialmente expressos relacionados com metabolismo e ação do estrógeno foram avaliados por RT-PCR quantitativa em tempo real, revelando o aumento de expressão dos genes *CYP19A1*, *ESR2* e *BGN*, bem como a diminuição de expressão dos genes *ESR1* e *PGR*. A análise de imunohistoquímica nas mesmas confirmou os baixos níveis de expressão dos receptores ER e PR nas células epiteliais das lesões ovarianas. Entretanto,

os dados de expressão do gene *ESR2* foram discordantes com os níveis de expressão do receptor ER .

Alterações hormonais na endometriose

A endometriose apresenta uma complexa etiopatogenia e diferentes formas de manifestação. Sabe-se que é mais prevalente em mulheres na idade reprodutiva e tende a regredir após a menopausa ou ooforectomia bilateral tratando-se, portanto, de uma afecção estrógeno-dependente (Kitawaki et al, 1997).

Quanto aos fatores indutores, a hipótese inicial sugere o mecanismo endócrino de ação do estradiol: esse hormônio sintetizado no ovário ou no tecido adiposo poderia atingir, através da circulação sanguínea, seus órgãos alvos e exerceria dessa forma seus efeitos. Porém, estudos têm demonstrado que, em certas doenças como o câncer de mama (Bulum et al, 1993), a miomatose uterina (Sumitani et al, 2000) e a endometriose (Bulun et al, 1994; Noble et al, 1996) a produção e a secreção de estrógeno *in situ* pode ter papel fundamental no desenvolvimento e progressão dessas doenças.

Em óvulos submetidos à fertilização *in vitro* e doados a mulheres em pós-menopausa, a administração exógena de estradiol (E2) e progesterona é suficiente para preparar o endométrio para implantação, na ausência de atividade ovariana. Esta observação ressalta o papel essencial destes esteróides na fisiologia do útero. Estrógeno e progesterona são, portanto, reguladores cruciais do tecido endometrial e estima-se que cada um desses hormônios regule a expressão de centenas de genes durante as várias fases

do ciclo menstrual. O endométrio eutópico torna-se atrófico em resposta a progesterona administrada por períodos prolongados ou em resposta a contraceptivos orais que contém progestina. O tratamento com esse agente, no entanto, não garante que o tecido endometriótico pare de crescer. Localizações ectópicas são fundamentalmente diferentes do endométrio eutópico em relação à produção de citocinas e prostaglandinas, biossíntese e metabolismo de estrogênio e resposta a progestinas. Existem diferenças moleculares substanciais no que se refere à resposta a progesterona entre os dois tecidos em mulheres com endometriose (Bulun et al, 2010).

O receptor de estrógeno beta age como um fator de transcrição que se associa aos promotores de genes responsivos ao estrógeno por via direta de ligação ao DNA, ou por ligação a outros fatores de transcrição. Esta interação leva ao início da transcrição de genes estrógeno-específicos, os quais promovem a síntese de RNAm e proteínas específicas. *PGR* é um de muitos genes E2 responsivos. Em adição, este hormônio age no endométrio eutópico e células do estroma para promover resposta endometrial à progesterona. Em contraste, níveis de RNAm e proteínas induzidas pelo receptor de progesterona não estão elevados em biópsias de tecido endometriótico expostos a altos níveis de E2 durante a fase proliferativa tardia ou em células endometrióticas tratadas com E2, indicando que a indução da expressão de *PGR* por E2 é interrompida (Attia et al, 2000).

Em resumo, acredita-se que mecanismos complexos que envolvem a regulação dos promotores podem ser responsáveis pelas anormalidades observadas na expressão dos genes *ESR1*, *ESR2* e *PGR* na endometriose. Em células endometrióticas, o promotor de *ESR2* está hipometilado podendo

elevar os níveis do receptor ER beta. ER beta suprime a expressão de *ESR1*, resultando em níveis aumentados de apenas um dos receptores nas células endometrióticas. Especula-se que baixos níveis de ER alfa em relação aos de ER beta poderiam causar uma mudança na estimulação de E2 e na expressão de *PGR*(Figura 1). Este mecanismo poderia elucidar as questões envolvendo a etiologia da deficiência de PGRB nas células endometrióticas, o que por sua vez causaria resistência aos tratamentos com progestinas nas mulheres portadoras da doença. Acredita-se que a perda de expressão de *PGRB* no estroma das células endometrióticas modificaria as interações estroma-epitélio causando alterações nas células epiteliais, deficiência de 17 -hidroxiesteróide desidrogenase-2, e resistência a progesterona (Bulun et al, 2010).

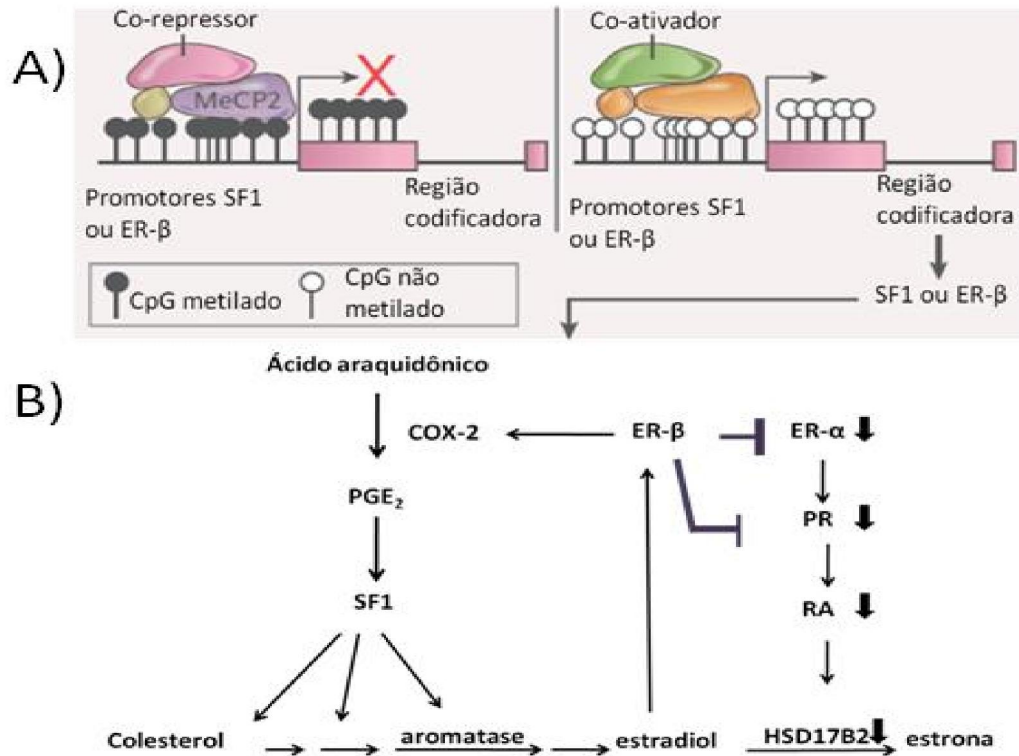


Figura 1: A) As regiões promotoras dos genes dos receptores nucleares *SF1* e *ESR2* encontram-se densamente metiladas nas células do estroma endometrial. A perda de metilação estaria associada ao aumento de expressão destes receptores na endometriose. B) O fator SF1 media a produção de estradiol dependente de prostaglandina E₂ (PGE₂). O receptor ER β suprime a expressão dos receptores de estrógeno ER α e de progesterona PR, levando à inativação deficiente de estradiol (E₂) em estrona (E₁). Os altos níveis de estradiol e PGE₂ aumentariam a sobrevivência celular e a inflamação na endometriose (modificado de Bulun, 2009).

Objetivo

Objetivo geral

Determinar o padrão de metilação dos genes que codificam os receptores dos hormônios esteróides na endometriose profunda intestinal.

Objetivos específicos

- 1- Determinar o padrão de metilação pela abordagem de MSP (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*) dos genes *ESR1* (*promotores A e B*), *ESR2* e *PGR* (*promotores A e B*) em amostras de endometriose profunda intestinal.
- 2- Relacionar os padrões detectados com os parâmetros clínico-histológicos e com o grau de estadiamento da doença de cada paciente.

Referências Bibliográficas

- Abrão 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: 31-40, 2003
- Abrão MS, Gonçalves MO, Dias JA Jr, Podgaec S, Chamie LP, Blasbalg R. Comparison between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis. *Hum Reprod* 22: 3092-7, 2007.
- Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 85: 2897-902, 2000.
- Barra GB, Velasco LF, Pessanha RP, Campos AM, Moura FN, Dias SM, Polikarpov I, Ribeiro RC, Simeoni LA, Neves FA. Molecular mechanism of thyroid hormone action]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 48: 25-39, 2004.
- Bestor TH, The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 9:2395-402, 2000.
- Bianchi A, Pulido L, Espin F, Hidalgo LA, Heredia A, Fantova MJ. Endometriose. *Cir Esp.* 81: 170-6, 2007.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 1: 166-21, 2002.
- Birmingham A. Endometriosis and infertility. *Fertil. Steril.* 86: 156-60, 2006.
- Brosens I, Puttemans P, Campo R, Gordts S and Kinkel K. Diagnosis of endometriosis: pelvic endoscopy and imaging techniques. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 18: 285-303, 2004.
- Bulun SE, Price TM, Aitken J, Mahendroo MS, Simpson ER. A link between breast cancer and local estrogen biosynthesis suggested by quantification of breast adipose tissue aromatase cytochrome P450 transcripts using competitive polymerase chain reaction after reverse transcription. *J Clin Endocrinol Metab.* 77: 1622-8, 1993.
- Bulun SE, Simpson ER, Word RA. Expression of the CYP19 gene and its product aromatase cytochrome P450 in human uterine leiomyoma tissues and cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab.* 78: 736-43, 1994.
- Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, Yilmaz B, Martin R, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, Tamura M, Langoi D, Deb S. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol Rev.* 57:359-83, 2005.

- Bulun SE, Cheng YH, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Attar E, Innes J, Julie Kim J. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol.* 27: 94-10, 2006.
- Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med.* 360: 268-79, 2009.
- Bulun SE, Cheng YH, Pavone ME, Xue Q, Attar E, Trukhacheva E, Tokunaga H, Utsunomiya H, Yin P, Luo X, Lin Z, Imir G, Thung S, Su EJ, Kim JJ. Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis. *Semin Reprod Med.* 28: 36-43, 2010.
- Cavallini A, Resta L, Caringella AM, Dinaro E, Lippolis C, Loverro G. Involvement of estrogen receptor-related receptors in human ovarian endometriosis. *Fertil Steril.* 2011
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res.* 57: 339-55, 2002.
- Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril.* 53: 978-83, 1990.
- Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, Berger MJ, Belisle S, Schiff I, Albrecht B, Gibson M, Stadel BV, Schoenbaum SC. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. *JAMA.* 255: 1904-8, 1986.
- Crosera AMLV, Vieira CHF, Samana M, Mmartinhago CD, Uneo J. Tratamento da endometriose associada à infertilidade. *Femina.* 38: 251-256, 2010.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 429: 457-63, 2004.
- Espada J, Esteller M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Semin Cell Dev Biol.* 21: 238-46, 2010.
- Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 8: 286-98, 2007.
- Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 24: 235-58, 1997.
- Fauconnier A, Chapron C. Endometriosis and pelvic pain: epidemiological evidence of the relationship and implications. *Hum Reprod Update.* 11: 595-606, 2005.
- Farquhar C. Endometriosis. *BMJ.* 3: 249-53, 2007.

- Figueira PG, Abrão MS, Krikun G, Taylor H. Stem cells in endometrium and their role in the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1221:10-7, 2011.
- Garcia A, Spadoni Neto B, Garcia VCS, Arruda P, Garcia DL. Endometriose colônica simulando câncer colorretal – Relato de dois Casos. *Rec Bras Coloproct.* 26: 316-320, 2006.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG Island in Vertebrate Genomes. *J Mol Biol.* 196: 261-82, 1987.
- Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD, Fisher SJ. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science.* 299:405-408, 2003.
- Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet.* 13:1789-99, 2004.
- Gronemeyer H, Gustafsson JA. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily 3: 950-964, 2004.
- Handel AE, Ebers GC, Ramagopalan SV. Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. *Trends Mol Med.* 16: 7-16, 2010.
- Hadfield RM, Mardon HJ, Barlow DH, Kennedy SH. Endometriosis in monozygotic twins. *Fertil Steril.* 68: 941-2, 1997.
- Illingworth RS, Bird AP. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett.* 583:1713-20, 2009.
- Indraccolo U, Trevisan P, Gasparin P, Barbieri F. Cecal endometriosis as a cause of ileocolic intussusception. *JSLs.* 14: 140-2, 2010.
- Kamergorodsky G, Ribeiro PA, Galvão MA, Abrão MS, Donadio N, Lemos NL, Aoki T. Histologic classification of specimens from women affected by superficial endometriosis, deeply infiltrating endometriosis, and ovarian endometriomas. *Fertil Steril.* 92: 2074-7, 2009.
- Kinkel K, Frei KA, Balleyguier C, Chapron C. Diagnosis of endometriosis with imaging: a review. *Eur Radiol.* 16: 285-98, 2006.
- Kitawaki J, Noguchi T, Amatsu T, Maeda K, Tsukamoto K, Yamamoto T, Fushiki S, Osawa Y, Honjo H. Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod.* 57: 514-9, 1997.
- Kitawaki J, Kado N, Ishihara H, Koshihara H, Kitaoka Y, Honjo H. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 83: 149-55, 2002.

- Koninckx PR, Martin DC. Deep endometriosis: a consequence of infiltration or retraction or possibly adenomyosis externa? *Fertil Steril*. 58: 924-8,1992.
- Koninckx PR, Oosterlync D, D'hooghe T, Meuleuman C. Deeply infiltrating endometriosis is a disease whereas mild endometriosis could be considered a non-disease. *Ann N York Acad Sci*. 734: 333-341, 1994.
- Koninckx PR, Barlow D, Kennedy S. Implantation versus infiltration: the Sampson versus the endometriotic disease theory. *Gynecol Obstet Invest*. 47 Suppl 1: 3-9; 1999.
- Kruitwagen RF, Poels LG, Willemsen WN, de Ronde IJ, Jap PH, Rolland R. Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertil Steril*. 55: 297-303, 1991.
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Buck CA, Schinnar R, Bilker W, Strom BL. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 79: 643-49, 1994.
- Mahutte NG, Arici A. Medical management of endometriosis-associated pain. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 30: 133-50, 2003.
- 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*. 1:398-406, 2002.
- Matorras R, Rodríguez F, Pijoan JI, Ramón O, Gutierrez de Terán G, Rodríguez-Escudero F. Epidemiology of endometriosis in infertile women. *Fertil Steril*. 63: 34-8,1995.
- Merrill JA. Endometrial induction of endometriosis across Millipore filters. *Am J Obstet Gynecol*. 94:780-90,1966.
- Meyer R. The current question of adenomyositis and adenomyomas in general and particular seroepithelial adenomyositis and sarcomatoid adenomyometritis. *Zentralbl Gynakol*. 43: 745-750, 1919.
- Moen MH, Schei B. Epidemiology of endometriosis in a Norwegian county. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 76: 559-62, 1997.
- Noble LS, Simpson ER, Johns A, Bulun SE. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 81: 174-9, 1996.
- Patrelli TS, Berretta R, Gizzo S, Pezzuto A, Franchi L, Lukanovic A, Nardelli GB, Modena AB. CA 125 serum values in surgically treated endometriosis patients and its relationships with anatomic sites of endometriosis and pregnancy rate. *Fertil Steril*. 95: 393-6, 2011.

- Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 50: 3-22, 2004.
- Rosa e Silva ACJS, Rosa e Silva JC, Ferriani RA. Serum CA-125 in the diagnosis of endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 96: 206-207, 2007.
- Remorgida V, Ferrero S, Fulcheri E, Ragni N, Martin DC. Bowel endometriosis: presentation, diagnosis, and treatment. *Obstet Gynecol Surv.* 62:461-70, 2007
- Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: *Fertil Steril* 67: 817-21, 1997.
- Rizner TL. Estrogen metabolism and action in endometriosis. *Mol Cell Endocrinol.* 307: 8-18, 2009.
- Rottach A, Leonhardt H, Spada F. DNA methylation-mediated epigenetic control. *J Cell Biochem.* 108:43-51, 2009.
- Sangi-Haghpeykar H, Poindexter AN 3rd. Epidemiology of endometriosis among parous women. *Obstet Gynecol.* 85: 983-92, 1995.
- Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 14:422-69, 1927.
- Sasson IE, Taylor HS. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Ann Acad Sci.* 1: 127:106-15, 2008.
- Seli E, Berkkanoglu M, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 30: 41-61, 2003.
- Signorello LB, Harlow BL, Cramer DW, Spiegelman D, Hill JA. Epidemiologic determinants of endometriosis: a hospital-based case-control study. *Ann Epidemiol.* 7: 267-741, 1997.
- Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram VC Jr. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol.* 1: 327-31, 1980.
- Sumitani H, Shozu M, Segawa T, Murakami K, Yang HJ, Shimada K, Inoue M. In situ estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyoma cells promotes cell growth probably via an autocrine/intracrine mechanism. *Endocrinology.* 141: 3852-61, 2000.
- Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19:3740-45, 2002.
- Trukhacheva E, Lin Z, Reierstad S, Cheng YH, Milad M, Bulun SE. Estrogen receptor (ER) beta regulates ERalpha expression in stromal cells derived from ovarian endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 94:615-22, 2009.

- Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res.* 659: 40-8, 2008.
- Vercellini P, Bocciolone L, Vendola N, Columbo A, Rognoni MT, Fedele L. Peritoneal endometriosis. Morphologic appearance in women with chronic pelvic pain. *J Reprod Med.* 36: 533-536, 1991.
- Vouk K, Smuc T, Guggenberger C, Ribi -Pucelj M, Sinkovec J, Husen B, Thole H, Houba P, Thaete C, Adamski J, Rižner TL. Novel estrogen-related genes and potential biomarkers of ovarian endometriosis identified by differential expression analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 125:231-42, 2011
- 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, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Guo SW. Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (PR-B) in endometriosis. *Epigenetics.* 1: 106-11, 2006.
- Wu Y, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Guo SW. Aberrant expression of deoxyribonucleic acid methyltransferases DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 87: 24-32, 2007.
- 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 in human endometrium and endometriosis. *Biol Reprod.* 77: 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: 3261-7, 2007b.

Artigo

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Fertility and Sterility*.

DNA methylation patterns of multiple promoters of the steroid receptor genes (*ESR1*, *ESR2*, and *PGR*) in intestinal deep endometriosis

Joana Ladeira Meyer, B.S.^{a}, Daniela Zimbardi, M.Sc.^{a*}, Maurício Simões Abrão, M.D., Ph.D.[†], Cláudia Aparecida Rainho, M.Sc., Ph.D.[†]*

^aDepartment of Genetics, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University - UNESP, Botucatu, Sao Paulo, Brazil and ^b Department of Gynecology and Obstetrics, Sao Paulo University - USP, Sao Paulo, Brazil.

* These authors contributed equally.

Supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grants 2008/53716-5 and 2008/52270-3) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Reprint requests: Cláudia Aparecida Rainho, Department of Genetics, Biosciences Institute, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, Sao Paulo, Brazil, 18618970 (E-mail: rainho@ibb.unesp.br).

Capsule

Aberrant methylation of promoter region B of the progesterone receptor gene (*PGR*) is an epigenetic mark specifically associated with intestinal deep endometriotic lesions.

Objective: Endometriosis has been hypothesized to be an epigenetic disease. Because endometriotic lesions contain a unique steroid hormone receptor expression profile, the aim of this study was to test the hypothesis that alternative promoters of the steroid receptor genes *ESR1*, *ESR2*, and *PGR* would be differentially methylated in intestinal deep endometriosis.

Design: A cross-sectional study of DNA methylation at the *PGR* gene (promoter region B) and *ESR2* gene on matched endometriotic lesions and endometrium samples as well as at the *ESR1* gene (promoters A and B) and *PGR* gene (promoter region A) on endometriotic lesions.

Setting: Academic.

Patient(s): Forty-four women with intestinal deep endometriosis.

Intervention(s): Fresh deep intestinal endometriotic samples were collected from 44 patients who underwent surgical laparoscopy. For seven patients, matched endometrial tissue samples were also obtained.

Main Outcome Measure(s): The CpG island methylation patterns of alternative promoter regions A and B of the *PGR* and *ESR1* genes and an intragenic region of the *ESR2* gene were evaluated using the methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) approach.

Result(s): Partial methylation of the *PGR* gene was observed in 39% (17/44) and 19% (7/37) of samples for promoter regions B (*PGRB*) and A (*PGRA*), respectively. *PGRB* methylated alleles were exclusively detected in endometriotic lesions when compared to eutopic endometrium obtained from the same patient. In contrast, methylated and unmethylated alleles were observed in all endometrium and endometriosis samples analyzed for *ESR1* and *ESR2*.

Conclusion(s): The aberrant methylation of the *PGRB* promoter is a specific epigenetic mark of endometriotic lesions. Future endometriosis research should investigate the relationship between *PGR* hypermethylation and progesterone resistance, as well the potential for the use of abnormal patterns of DNA methylation as prognostic biomarkers in this complex disease.

Key word: DNA methylation, endometriosis, epigenetics, CpG island, steroid hormone receptors, biomarkers

INTRODUCTION

In the past few decades, epigenetic mechanisms have been recognized as key factors in the development of complex human disorders, including cancer and neurodegenerative, neurological and autoimmune diseases (1). Changes in chromatin conformation are the basis of epigenetic effects because they can alter gene expression and do not depend on DNA sequence mutations. Chromatin epigenetic mechanisms include DNA methylation and the post-translational covalent modifications of histones. These modifications comprise heritable changes that regulate essential biological processes, such as gene and microRNA expression, cellular differentiation, X-chromosome inactivation and genomic imprinting. DNA methylation is the most widely studied and best characterized epigenetic modification of the human genome (2). It is catalyzed by DNA methyltransferases (DNMTs), which add a methyl group to the carbon 5 of cytosines that are followed by a guanine. Thus, DNA methylation occurs almost exclusively in the context of a 5'-CpG-3' dinucleotide, especially in dense CpG regions termed CpG islands. Promoter-specific CpG island hypermethylation is known to be associated with gene silencing due to their transcription repression effect (3).

Recent evidence indicates that endometriosis, an enigmatic disease in which lesions of endometrial-like tissue are detected outside the uterine cavity, is an epigenetic disease. This hypothesis was based on the abnormal DNA methylation patterns observed in the promoter regions of specific genes (4-6) and the higher expression levels of DNMTs in endometriotic lesions in comparison with normal endometrium (7). The first evidence of increased levels of DNA methylation of a specific gene came from the pioneering study by Martini et al. (8), which reported aberrant DNA methylation in the tumor suppressor genes *TP16* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) and *hMLH1* (mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2) in one and four samples of endometriosis, respectively. Subsequently, by using a candidate gene approach, others studies have described aberrant methylation patterns in the

promoter region of genes encoding the transcription factor homeobox 10A (*HOXA10*) (9), progesterone receptor (*PGR*) (10, 11), estrogen receptor 2, ERbeta (*ESR2*) (12), and nuclear receptor subfamily 5 (*NR5A1*, primed named SF-1 or steroidogenic factor-1) (13) in endometriotic lesions derived from different anatomical sites. Furthermore, cultured endometriotic cells treated with the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine showed an increase in the expression of aromatase mRNA, suggesting that DNA methylation of the *CYP19A1* gene also occurs in stromal cells from endometriotic lesions (14).

Endometriosis is believed to be an estrogen-dependent disease characterized by the loss of progesterone-protective signaling in endometriotic cells. Xue et al. (12) demonstrated that this effect could be related to hypomethylation of the *ESR2* gene in stromal endometriotic cells, which could lead to an increase in the expression of estrogen receptor (ER) and consequent inhibition of the *PGR* gene (15). These authors also demonstrated the presence of DNA methylation in a specific region of *ESR2* that confers promoter activity and co-localizes with a CpG island. *In vitro* methylation was correlated with inactivation of this promoter. In addition, hypermethylation of the *PGR* gene, particularly at promoter B, was also observed in the epithelial component of the endometriotic lesions (10).

The *ESR1* (estrogen receptor 1, alpha), *ESR2*, and *PGR* genes are regulated by alternative promoters. *ESR1* has two proximal promoters (A and B) located within ~2kb of the translation start site and an upstream promoter C (16, 17). Similarly, the *PGR* gene has two variant transcripts regulated by two promoter specific regions for the *PGRA* and *PGRB* isoforms, which are associated with well-characterized CpG islands (18). However, no studies have systematically investigated the methylation patterns of steroid hormone receptor genes in intestinal deep endometriosis, which accounts for 8-12% of all endometrioses (19). Therefore, this study was conducted to investigate the methylation patterns of the *ESR1*, *ESR2*, and *PGR* genes in this condition.

MATERIAL AND METHODS

Fresh endometriotic tissues were obtained from 44 cycling premenopausal patients who underwent laparoscopy for diagnosis and surgical resection. Matched endometrial tissue samples were simultaneously collected from seven patients. Furthermore, these patients were free of hormone treatment for at least three months prior to this intervention. Approval for the study for research on human subjects was obtained from the Institutional Review Board of the Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas and the Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesp – USP). All samples were collected after each patient provided informed consent. The classification system followed the American Society for Reproductive Medicine's recommendations for staging (I-IV) (Revised American Fertility Society classification of endometriosis - ASRM, 1997) (20). After histological confirmation of a diagnosis of endometriosis, lesions were morphologically classified as stromal, well-differentiated, undifferentiated, or mixed endometriosis following the previously described criteria (21).

All tissue samples were kept on dry ice immediately after surgical resection, stored in a -80°C freezer, and subsequently manually macrodissected. Genomic DNA was obtained by standard sodium dodecyl sulfate/proteinase K digestion, followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. DNA conversion by sodium bisulfite was performed using an established protocol (22), with modifications. The CpG island methylation pattern of alternative promoter regions A and B of *PGR*, promoter regions A and B of *ESR1*, and an intragenic CpG island in the *ESR2* gene was evaluated using the methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) approach. Primers specific to the methylated and unmethylated sequences of each gene were as previously described by Sasaki et al. (23) (Table 1). The reactions were performed in a total volume of 25µL containing 0.16µM (*ESR2* and *ESR1 A* genes), 0.48µM (*ESR1 B* gene), 0.08µM (*PGR A* gene) or 0.24µM (*PGR B* gene)

of each primer, 200 μ M of each dNTP, 15mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM KCl, 1U of AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 2.5mM MgCl₂ for *ESR1A* and *PGRA*, 3mM MgCl₂ for *ESR2* and 4mM MgCl₂ for *ESR1B* and *PGRB*. Amplification conditions are listed in Table 1. The amplified products were visualized after electrophoresis on a 6% polyacrylamide gel, followed by silver nitrate staining. Water blanks were included in each assay.

The descriptive mean and percent statistics were used to summarize patient data. The presence of methylation and characteristics, including age and clinico-histopathological parameters, were evaluated using the Fisher's exact test. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The mean patient age was 35.1 \pm 6.8 years. The more frequent symptomatology included moderate to severe dysmenorrhea (n = 39, 89% of cases), dyspareunia (n = 29, 66% of cases) and infertility (n = 24, 55% of cases). According to the American Society of Reproductive Medicine's revised classification of endometriosis (20), the lesions were classified as stage I (n = 7), II (n = 6), III (n = 3), and IV (n = 28).

After genomic DNA modification by sodium bisulfite and MSP analysis, the *PGRB* promoter and *ESR2* intragenic region methylation patterns were obtained for all 44 endometriosis samples. Unmethylated and methylated alleles were detected for the *ESR2* gene in all samples. *PGRB* promoter methylation was observed in 39% (17/44) of endometriotic lesions. In seven of the 44 samples, it was also possible to determine the methylation pattern in paired endometrium obtained from the same patients. No difference was observed in the *ESR2* methylation pattern in these cases; however, only unmethylated alleles were observed in the *PGRB* promoter region. Interestingly, direct comparison of the *PGRB* promoter region

methylation pattern between matched endometrium and endometriosis samples revealed discordant data in four pairs because hypermethylated alleles were specifically present in the endometriotic tissue (Figure 1).

Due to the limited DNA quantity, MSP analysis of the *ESR1A*, *ESR1B* and *PGRA* promoters was performed in a subset of 37 of the 44 single lesion samples. While methylated and unmethylated alleles were simultaneously detected for both *ESR1* promoters in all of these samples, *PGRA* methylated alleles were only detected in seven lesions (19%). No statistically significant differences were observed between the presence of methylation in the *PGR A* and *B* promoters and stage of the lesions (I + II versus III + IV) (p-value = 0.65 and 0.52 for *PGRA* and *PGRB*, respectively, Fisher's exact test). Furthermore, the presence of methylation in the *PGR* gene promoters was not associated with age.

Histological classification (21) was performed in 34 cases and showed a predominantly glandular pattern of mixed differentiation (n = 24) or an undifferentiated glandular pattern (n = 10). These patterns were not associated with DNA methylation in the *PGRA* and *PGRB* promoter regions.

DISCUSSION

The major finding of our study is that promoter region *B* of the *PGR* gene differs in methylation status between eutopic endometrium and intestinal deep endometriosis; methylated alleles were specifically detected in endometriotic lesions, while all endometrium samples showed only unmethylated alleles. Using the same MSP primer set, Wu et al. (10) reported the presence of partial methylation in this promoter region in the epithelial component of peritoneal and ovarian endometriotic implants, but not in the promoter that controls expression of the A isoform. In addition, the authors reported low levels of *PGRB* expression in endometriotic epithelial cells. Our results in intestinal endometriotic lesions

support these findings because 17 cases (39%) showed methylation of the *PGR* gene: 13 samples were methylated in the *PGRB* promoter, seven were methylated at the *PGRA* promoter, and three were methylated at both promoters. It has been proposed that the *PGRB* isoform is crucial for mediating the inhibitory effects of progesterone on cell growth and invasion, while *PGRA* has a suppressor function (24, 25). Taken together, these data support the assumption that endometriotic lesions show a trend of partial methylation of the *PGR* gene. This observation could explain the low expression level of progesterone receptors in endometriosis and could be associated with the fact that approximately 9% of women with endometriosis do not respond to treatment with progestin (5).

From a translational research perspective, gene-specific methylation patterns may be useful biomarkers for detection because DNA methylation changes potentially provide a positive signal for endometriotic cell detection. MSP is a very sensitive PCR-based method, and it has been used to detect hypermethylated genes in limited quantity samples derived from patients with various types of malignancies, such those obtained from fine needle aspiration, biopsies, and corporal fluids (26). In this context, epigenetic studies could lead to the identification of the target genes of aberrant DNA methylation in endometriosis, thus representing a promising area for the monitoring of the onset and progression of the disease, as well as prediction of therapy response.

Currently, endometriotic lesions have been described as estrogen-dependent endometrium-like tissue consisting of glands and stroma. This abnormal tissue shows a unique expression profile of steroid hormone receptors compared to matched eutopic endometrium or endometrium from women without endometriosis. Previous studies have detected lower levels of ER α and higher levels of ER β in endometriosis (27, 28). ER α appears to be the primary mediator of estradiol-induced progesterone action in this tissue (29), and

progesterone exerts its functions in the endometrium by binding to the nuclear receptors PGRA and PGRB.

Epigenetic mechanisms modulate the dynamic regulation of the estrogen receptor genes and their functions (29). Promoter-specific DNA methylation could be causally related to the differential expression of the ER α and ER β receptors in endometriosis. These receptors have differential affinity for ligands, are differentially expressed in a tissue-specific manner and may function antagonistically (30). Both ER isoforms exist as several splice variants. The alternative transcripts are ubiquitous, although their biological significance remains poorly understood (31). Furthermore, alternative promoter usage leads to pre-mRNAs with a variable length non-coding 5' untranslated region, although the polypeptides are identical (32-34).

In breast cancer cell lines, *ESR1* expression was suppressed by promoter DNA methylation (35, 36) and histone hypoacetylation (37) and was derepressed by DNA methyltransferase (5-aza-2'-deoxycytidine) and histone deacetylase (trichostatin A) inhibitors (38, 39). Promoter region hypermethylation has also been shown to be inversely associated with *ESR2* expression levels (40).

To the best of our knowledge, only one study has evaluated the methylation status of the *ESR2* gene in eight ovarian endometriomas by bisulfite-modified DNA sequencing (12). The authors described high levels of *ESR2* transcripts associated with hypomethylation of the respective promoter region in comparison with endometrium. Contrarily, in the present study, MSP analysis targeting the gene body CpG island of *ESR2* in endometria and intestinal deep endometriosis matched samples showed a more complex pattern, with methylated and unmethylated alleles in both tissues. In the human genome, most methylated CpG islands are intragenic, and the effect on transcription is unclear. Several studies have indicated an important role for promoter region hypermethylation in transcriptional repression; however, some intragenic CpG islands not associated with alternative promoters could facilitate

transcription by preventing spurious transcription initiation that could otherwise interfere with correct expression of the full-length transcript (3). In this context, it is tempting to speculate whether the *ESR2* gene could generate multiple transcripts by triggering transcription initiation at alternative sites that could be inactivated by tissue-specific methylation. Therefore, interpretation of differential DNA methylation patterns has proven difficult, in part because the functional consequences depend on the genomic region involved, the specific CpG dinucleotides, and inter- and intratissue heterogeneity.

This study is the first to investigate the methylation pattern at the *ESR1* gene in endometriosis. We found methylated alleles at both promoters A (*ESR1A*) and B (*ESR1B*). It has been hypothesized that ER variants may have a positive or negative influence on transcription, either by modifying the effect of the parent receptor or through their own intrinsic activity, influencing hormone responsiveness and control (31).

In summary, these data indicate that abnormal methylation patterns occur in intestinal deep endometriosis. Further studies may elucidate the possible relationship between DNA hypermethylation of the *PGRB* promoter and progesterone resistance. In addition, future epigenetic studies involving the evaluation of steroid receptor methylation in endometriosis should consider the histological pattern and each component separately (stromal or epithelial) in order to verify the effect of DNA methylation on the expression of each alternative steroid receptor transcript in this complex disorder.

Acknowledgments

The authors would like to thank the FAPESP and CAPES for their financial support. We also thank Ana Carolina Machado Poppe for technical support and Annacarolina F.L. da Silva and Alexandre Fabro for histopathological analysis and tissue macrodissection.

References

1. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010; 28:1057-68.
2. Ballestar E. An introduction to epigenetics. *Adv Exp Med Biol* 2011; 711:1-11.
3. Illingworth RS, Bird AP. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett* 2009; 583:1713-20.
4. Guo SW. Epigenetics of endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2009; 15:587-607.
5. Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med* 2009; 360:268-79.
6. Nasu K, Kawano Y, Tsukamoto Y, Takano M, Takai N, Li H, Furukawa Y, Abe W, Moriyama M, Narahara H. Aberrant DNA methylation status of endometriosis: Epigenetics as the pathogenesis, biomarker and therapeutic target. *J Obstet Gynaecol Res* 2011 Jun 9. doi: 10.1111/j.1447-0756.2011.01663.x.
7. Wu Y, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Guo SW. Aberrant expression of deoxyribonucleic acid methyltransferases DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2007; 87:24-32.
8. 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* 2002; 102:398-406.
9. 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* 2005; 193:371-80.
10. Wu Y, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Guo SW. Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (PR-B) in endometriosis. *Epigenetics* 2006; 1:106-11.
11. Wu Y, Shi X, Guo SW. The knockdown of progesterone receptor isoform B (PR-B) promotes proliferation in immortalized endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2008; 90:1320-3.
12. 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 in human endometrium and endometriosis. *Biol Reprod* 2007; 77:681-7.
13. 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* 2007; 92:3261-7.

14. Izawa M, Taniguchi F, Uegaki T, Takai E, Iwabe T, Terakawa N, Harada T. Demethylation of a nonpromoter cytosine-phosphate-guanine island in the aromatase gene may cause the aberrant up-regulation in endometriotic tissues. *Fertil Steril* 2011; 95:33-9.
15. Bulun SE, Cheng YH, Pavone ME, Xue Q, Attar E, Trukhacheva E, Tokunaga H, Utsunomiya H, Yin P, Luo X, Lin Z, Imir G, Thung S, Su EJ, Kim JJ. Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis. *Semin Reprod Med* 2010; 28:36-43.
16. Grandien K. Determination of transcription start sites in the human estrogen receptor gene and identification of a novel, tissue-specific, estrogen receptor-mRNA isoform. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 116:207-12.
17. Grandien K, Berkenstam A, Gustafsson JA. The estrogen receptor gene: promoter organization and expression. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29:1343-69.
18. Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14:8356-64.
19. Wills HJ, Reid GD, Cooper MJ, Morgan M. Fertility and pain outcomes following laparoscopic segmental bowel resection for colorectal endometriosis: a review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2008; 48:292-5.
20. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: *Fertil Steril* 67: 817-21, 1997.
21. 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* 2003; 82:31-40.
22. Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA. Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 1998; 26:5009-10.
23. Sasaki M, Tanaka Y, Perinchery G, Dharia A, Kotcherguina I, Fujimoto S, Dahiya R. Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:384-90.
24. Dai D, Wolf DM, Litman ES, White MJ, Leslie KK. Progesterone inhibits human endometrial cancer cell growth and invasiveness: down-regulation of cellular adhesion molecules through progesterone B receptors. *Cancer Res* 2002; 62:881-6.
25. Wu Y, Shi X, Guo SW. The knockdown of progesterone receptor isoform B (PR-B) promotes proliferation in immortalized endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2008; 90:1320-3.

26. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:253-66.
27. Brandenberger AW, Lebovic DI, Tee MK, et al. Oestrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta isoforms in normal endometrial and endometriosis-derived stromal cells. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:651-655.
28. Fujimoto J, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T. Expression of oestrogen receptor- alpha and -beta in ovarian endometriomata. *Mol Hum Reprod* 1999; 8:742-747.
29. Leader JE, Wang C, Popov VM, Fu M, Pestell RG. Epigenetics and the estrogen receptor. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1089:73-87.
30. Ström A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101:1566-71.
31. Taylor SE, Martin-Hirsch PL, Martin FL. Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. *Cancer Lett* 2010; 288:133-48.
32. Flouriot G, Griffin C, Kenealy M, Sonntag-Buck V, Gannon F. Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor-alpha gene are generated by alternative splicing and promoter usage. *Mol Endocrinol* 1998; 12:1939-54.
33. Lu B, Leygue E, Dotzlaw H, Murphy LJ, Murphy LC, Watson PH. Estrogen receptor-beta mRNA variants in human and murine tissues. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 138:199-203.
34. Lu B, Dotzlaw H, Leygue E, Murphy LJ, Watson PH, Murphy LC. Estrogen receptor-alpha mRNA variants in murine and human tissues. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 20:158:153-61.
35. Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, Smith HS, Baylin SB, Davidson NE. Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1994; 54:2552-5.
36. Lapidus RG, Nass SJ, Davidson NE. The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998; 3:85-94.
37. Sharma D, Saxena NK, Davidson NE, Vertino PM. Restoration of tamoxifen sensitivity in estrogen receptor-negative breast cancer cells: tamoxifen-bound reactivated ER recruits distinctive corepressor complexes. *Cancer Res* 2006; 66:6370-8.
38. Macaluso M, Montanari M, Noto PB, Gregorio V, Bronner C, Giordano A. Epigenetic modulation of estrogen receptor-alpha by pRb family proteins: a novel mechanism in breast cancer. *Cancer Res* 2007; 67:7731-7.
39. Sharma D, Blum J, Yang X, Beaulieu N, Macleod AR, Davidson NE. Release of methyl CpG binding proteins and histone deacetylase 1 from the Estrogen receptor alpha (ER)

promoter upon reactivation in ER-negative human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2005; 19:1740-51.

40. A. Rody, U. Holtrich, C. Solbach, K. Kourtis, G. von Minckwitz, K. Engels, S. Kissler, R. Gätje, T. Karn, M. Kaufmann. Methylation of estrogen receptor b promoter correlates with loss of ER-b expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions, *Endocr. Relat Cancer* 2005;12:903-16.

Table 1. PCR primer sequences and amplification conditions used in the MSP analysis of *PGR1A*, *PGR1B*, *ESR1A*, *ESR1B* and *ESR2* genes (23).

Primer	Sequence	Amplification conditions	
PGR1A-UF	5'-ATGGGTTATTTTTTTTTTTG-3'	1 cycle:	95°C – 10min
PGR1A-UR	5'-TAAAATATACACCCTCCACA-3'	35 cycles:	95°C – 1min 51°C – 1min 72°C – 1min
PGR1A-MF	5'-ACGGGTTATTTTTTTTTTCG-3'		
PGR1A-MR	5'-TAAAATATACGCCCTCCACG-3'	1 cycle:	72°C – 1min
PGR1B-UF	5'-TGATTGTTGTTTGTAGTATG- 3'	1 cycle:	95°C – 10min
PGR1B-UR	5'-CAACAATTTAATAACACACA- 3'	35 cycles:	95°C – 1min 50°C – 1min 72°C – 1min
PGR1B-MF	5'-TGATTGTCGTTTCGTAGTACG- 3'		
PGR1B-UR	5'-CGACAATTTAATAACACGCG- 3'	1 cycle:	72°C – 1min
ESR1A-UF	5'-GGATATGGTTTGTATTTTGTGTTGT-3'	1 cycle:	95°C – 10min
ESR1A-UR	5'-ACAAACAATTCAAAACTCCAAC-3'	35 cycles:	95°C – 1min 54°C (U)/50°C (M) – 1min 72°C – 1min
ESR1A-MF	5'-GATACGGTTTGTATTTTGTTCGC-3'		
ESR1A-MR	5'-CGAACGATTCAAAACTCCAAC-3'	1 cycle:	72°C – 1min
ESR1B-UF	5'-TTTATTGTTATTTATTTAGT-3'	1 cycle:	95°C – 10min
ESR1B-UR	5'-AAAAATATACTCATATACA-3'	35 cycles:	95°C – 1min 47°C (U)/49°C (M) – 1min 72°C – 1min
ESR1B-MF	5'-TTTATTGTTATTTATTTAGC-3'		
ESR1B-MR	5'-AAAAATATACTCGCATATACG-3'	1 cycle:	72°C – 1min
ESR2-UF	5'-TTTGGAAGGTGGGTTTGGTT-3'	1 cycle:	95°C – 10min
ESR2-UR	5'-CACATACAAATATAAATAACTAACA-3'	35 cycles:	95°C – 1min 54°C – 1min 72°C – 1min
ESR2-MF	5'-TTTGGAAGGTGGGTTTGGTC-3'		
ESR2-MR	5'-CGCATACAAATATAAATAACTAACG-3'	1 cycle:	72°C – 1min

Note: MF = Methylated Forward Primer; MR = Methylated Reverse Primer; UF = Unmethylated Forward Primer; UR = Unmethylated Reverse Primer; bp = base pair.

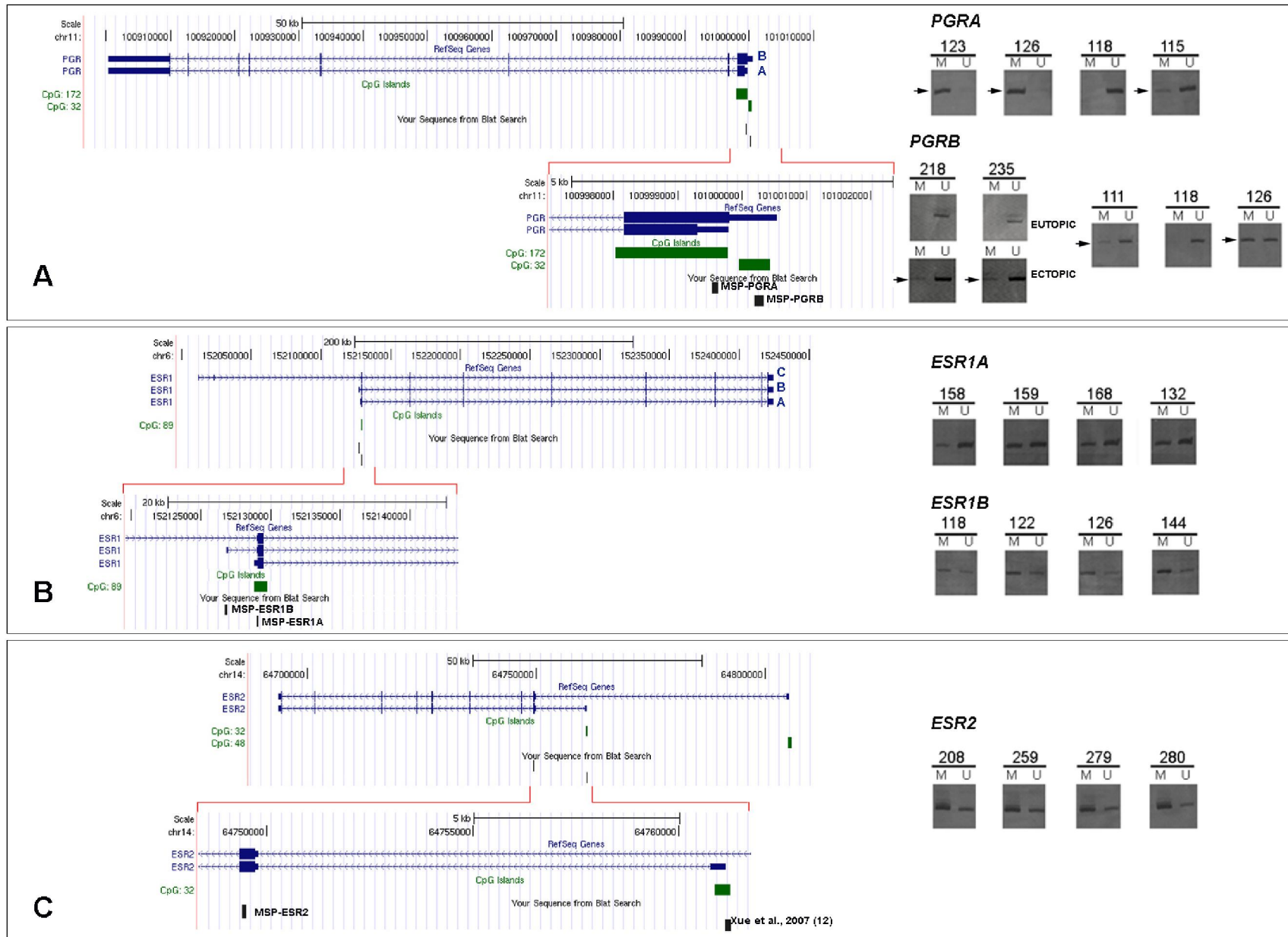


FIGURE 1. MSP analysis of steroid receptor genes in intestinal deep endometriosis. **A, B,** and **C)** UCSC browser representation of the alternative transcripts of *PGR*, *ESR1* and *ESR2* genes (blue), associated CpG islands (green) and respective MSP assays (black) (UCSC Genome Browser on Human, Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly, available at <http://genome.ucsc.edu/>). **A)** MSP results of *PGR* gene showing methylation of promoter A (cases 123, 126, and 115) and of promoter B (cases 218, 235, 111, and 126). Methylated alleles in cases 218 and 235 were detected only in the ectopic endometriosis (arrows). **B** and **C)** Methylated and unmethylated alleles were detected evenly after MSP analysis of *ESR1* (promoters A and B) and *ESR2* genes in all cases. (M – methylated alleles; U – unmethylated alleles).

Conflict of interest

None of the authors have financial or any other conflict of interests that might prejudice the interpretation or presentation of the data contained within this manuscript.

Conclusões

- Dentre os genes estudados, os promotores A e B do gene *PGR* encontram-se diferencialmente metilados na endometriose intestinal profunda, enquanto que alelos metilados e não metilados foram uniformemente detectados em todas as amostras analisadas para os genes *ESR1* (promotores A e B) e *ESR2*.
- A presença de metilação na região promotora B do gene *PGR* é uma marca epigenética específica da endometriose: alelos metilados foram exclusivamente detectados nas lesões endometrióticas enquanto que alelos não metilados foram encontrados nas lesões e no endométrio eutópico das mesmas pacientes.
- Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a metilação nos promotores A e B do gene *PGR* e o estágio da lesão (I+II *versus* III+IV). Além disso, a presença de metilação também não foi correlacionada com a idade ou com o padrão histológico.

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 / /

Apêndices

Apêndice I

A - Avaliação preliminar *in silico*

Os oligonucleotídeos iniciadores para as análises de MSP dos genes *ESR1* (promotores A e B), *ESR2* e *PGR* (promotores A e B) foram relatados por Sasaki et al. (2002) e tiveram suas sequências confirmadas pela avaliação *in silico*. Além da confirmação de suas sequências também consideramos outras características importantes da região em análise, como a caracterização da ilha CpG e a posição de anelamento dos *primers* em relação ao sítio de início da transcrição.

Inicialmente, as sequências de cada um dos genes foram identificadas em bancos de dados públicos (<http://genome.ucsc.edu>), incluindo 2.000 pb *upstream* ao primeiro éxon. A sequência selecionada foi submetida à simulação da modificação pelo bissulfito de sódio em que todas as citosinas foram substituídas por timina, considerando-se a ausência de metilação e, para a condição metilada, apenas as citosinas não CpG foram convertidas. As sequências resultantes foram alinhadas contra os respectivos *primers* na ferramenta *BLAST 2 Sequences* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>). Todos os *primers* apresentaram 100% de identidade com as sequências investigadas e delimitaram o tamanho dos *amplicons* para as respectivas reações de MSP.

Uma segunda avaliação foi realizada utilizando a ferramenta MethBLAST (<http://medgen.ugent.be/methBLAST/>) que permitiu a análise da especificidade dos *primers* selecionados para este estudo. A partir dos melhores *hits*, a região delimitada pelos *primers* foi recuperada e alinhada no genoma humano usando o UCSC *Genome Browser on Human*, Feb. 2009 (GRCh37/hg19) *Assembly* (<http://genome.ucsc.edu>). Os dados de alinhamento confirmaram o tamanho esperado para os *amplicons* (*ESR1* – promotor A, 122pb; *ESR1* promotor B, 179pb;

ESR2, 164pb; *PGR*, promotor A, 98pb e *PGR*promotor B, 199pb) e o mapeamento das regiões alvos dos ensaios de MSP nos respectivos *locus*. As figuras 1 a 3 ilustram estes dados.

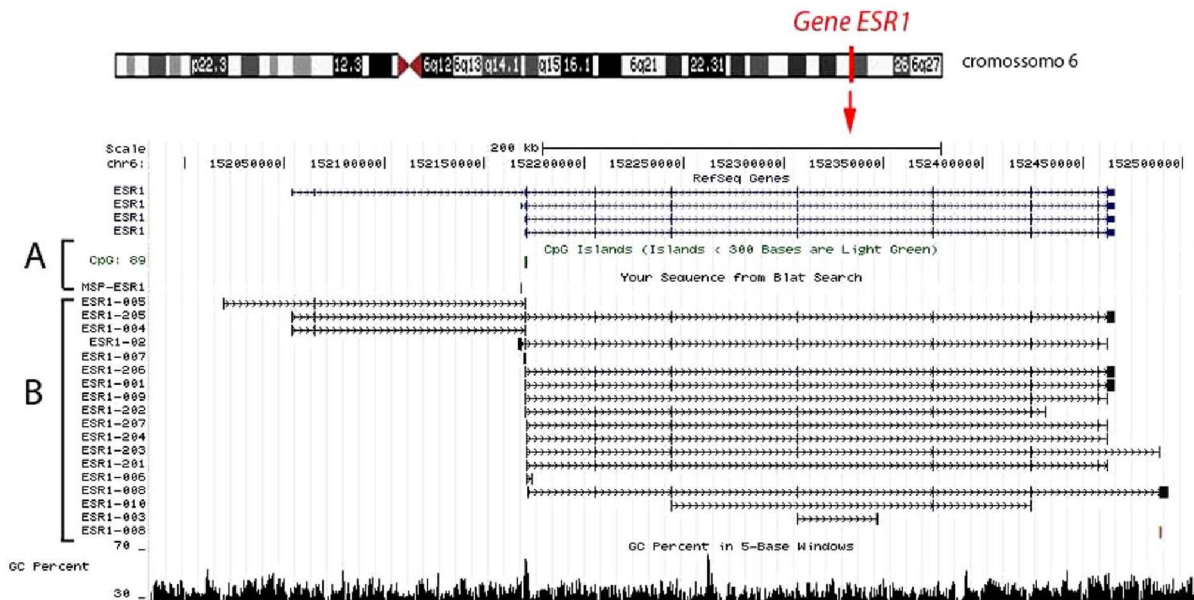


Figura 1. Dados de mapeamento da região alvo do ensaio de MSP próximo à localização da ilha CpG 89 na região promotora A do gene *ESR1* (A). Em B estão apresentados os diferentes transcritos alternativos deste gene. [*Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway, assembly: Feb.2009 (GRCh37/hg19)*, disponível em http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway_1, acesso em dezembro/2010)

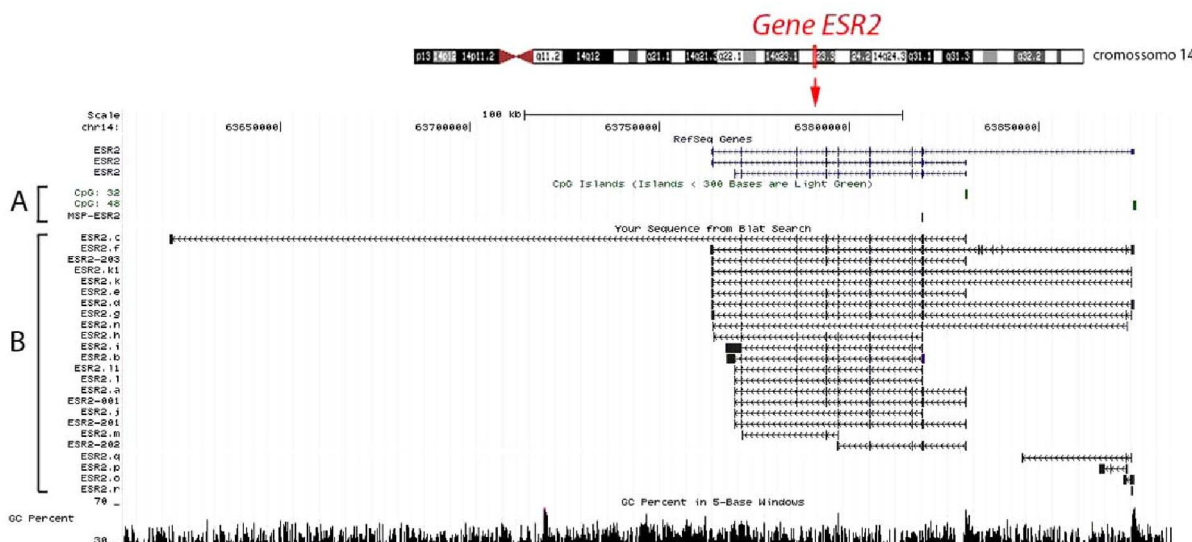


Figura 2. Dados de mapeamento da região alvo do ensaio de MSP do gene *ESR2* (A). Em B estão apresentados os diferentes transcritos alternativos deste gene indicando a sobreposição entre a região alvo e a região 5'UTR de algumas isoformas [*Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway, assembly: Feb.2009 (GRCh37/hg19)*, disponível em <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, acesso em dezembro/2010).

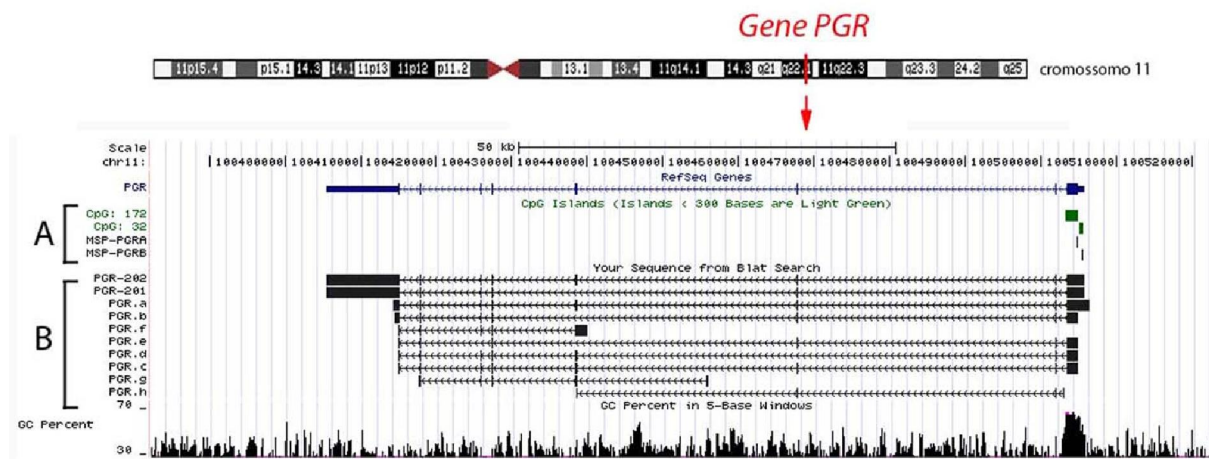


Figura 3. Dados de mapeamento das regiões alvo do ensaio de MSP para o gene *PGR* que se sobrepõem às ilhas CpG 172 (promotor A) e 32 (promotor B) (A). Em B estão apresentados os diferentes transcritos alternativos deste gene. [*Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway, assembly: Feb.2009 (GRCh37/hg19)*, disponível em <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, acesso em dezembro/2010).

B - Padronização da técnica de MSP

Para a padronização dos ensaios de MSP foram selecionadas linhagens celulares derivadas de câncer de mama (MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-415) e de doença fibrocística da mama (MCF10A) para as quais há dados disponíveis em

literatura sobre o padrão de metilação do gene *ESR1* e/ou dados de expressão dos receptores ER- e PR por RT-PCR e/ou imunohistoquímica.(Pilat et al, 1998; Kang et al, 2005; Tang et al, 2005; Neve et al, 2006).

A tabela abaixo apresenta a relação dos resultados da MSP de cada linhagem celular, bem como os dados de imunohistoquímica relatados em literatura (Neves et al, 2006) para as linhagens escolhidas.

A figura 4 apresenta os dados da análise de metilação dos genes *ESR1B* e *ESR2* para as linhagens celulares MDA-MB-23, MDA-MB-415, MCF7 e MCF10A. Os dados relativos aos promotores A e B do gene *PGR* estão mostrados na figura 5.

Tabela. Dados de imunohistoquímica segundo Neves et al (2006) e resultados da análise de MSP para as linhagens celulares derivadas de câncer de mama

Linhagem	IHQ		MSP							
	ER	PR	<i>ESR1B</i>		<i>ESR2</i>		<i>PGRA</i>		<i>PGRB</i>	
			M	U	M	U	M	U	M	U
MCF-7	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
MCF10A	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
MDA MB 231	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
MDA MB 415	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+

IHQ, imunohistoquímica; MSP, *Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*; ER, receptor de estrógeno; PR, receptor de progesterona; *ESR1B*, *Estrogen receptor 1 promoter B*; *ESR2*, *Estrogen receptor 2*; *PGRA*, *Progesterona receptor promoter A*; *PGRB* *Progesterona receptor promoter B*; M, *methylated*; U, *Unmethylated*

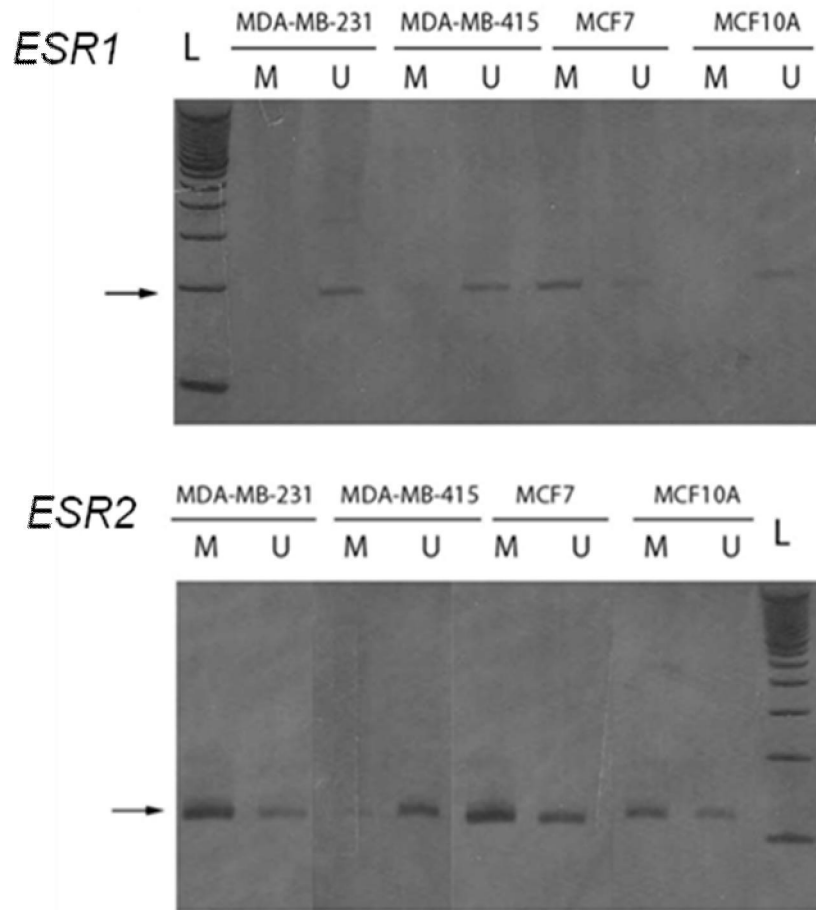


Figura 4. Análise de MSP dos genes *ESR1B* e *ESR2* em amostras de DNA utilizadas para a padronização das reações de amplificação indicando a especificidade do produto obtido. M – alelo metilado; U- alelo não metilado, L- marcador de tamanho molecular 100pb DNA Ladder.

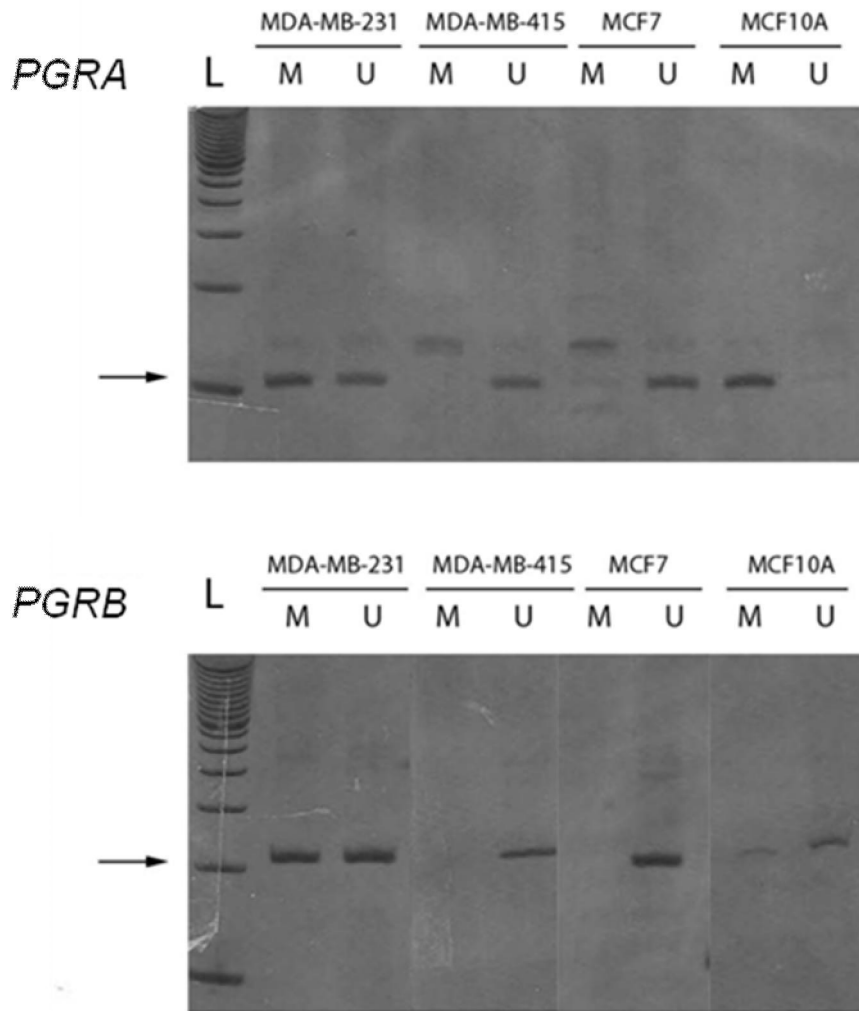


Figura 5. Análise de MSP do gene *PGR* em amostras de DNA utilizadas para a padronização das reações de amplificação indicando a especificidade do produto para o ensaio do promotor B (*PGRB*). Para o promotor A além do produto esperado foram detectadas algumas bandas inespecíficas. M – alelo metilado; U - alelo não metilado, L- marcador de tamanho molecular 100pb DNA Ladder.

Apêndice II

Tabela. Resultados das análises de MSP e dados clínicos-histopatológicos das pacientes envolvidas no estudo.

Casos	ESR1 A	ESR1 B	ESR2	PGH A	PGH B	Idade	Dismenorréia	Dispareunia	Esterilidade	Sintoma principal	Medicação	CA125	Estadiamento *	Tipo Histológico **
	M U	M U	M U	M U	M U									
Amostras pareadas														
157 EU 157 EC			+ + + +		- + - +	38	Severa	Ausente	Sem tentativas	Dismenorréia	-	0	3	E + M
185 EU 185 EC			+ + + +		- + + +	33	Ausente	Ausente	Primária	Dor ao evacuar	ACO	11	1	E + M
190 EU 190 EC			+ + + +		- + + +	36	Incapacitante	Profundidade	Primária	Dismenorréia	Análogo GnRH e ACO	17	4	E + M
207 EU 207 EC			+ + + +		- + - +	39	Incapacitante	Ausente	Secundária	Dismenorréia	Endoceptivo	0	1	Não Determinada
218 EU 218 EC			+ + + +		- + + +	58	Severa	Profundidade	Não	-	NR	NR	4	E + M
235 EU 235 EC			+ + + +		- + + +	29	Moderada	Profundidade	Primária	NR	-	0	2	E + M
256 EU 256 EC			+ + + +		- + - +	32	Ausente	Profundidade	Primária	-	Análogo GnRH	0	4	E + M
Amostras Endometriose														
91	+ +	+ +	+ +	- +	- +	34	Ausente	Profundidade	Não	Dor acíclica	-	0	1	Não Determinada
97	+ +	+ +	+ +	- +	- +	37	Severa	Profundidade	Primária	Dismenorréia	ACO	0	4	Não Determinada
102	+ +	+ +	+ +	- +	- +	37	Incapacitante	Profundidade	Não	Dismenorréia	Não	0	4	E + S
115	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	37	Severa	Profundidade	Secundária	Dismenorréia	ACO	0	4	Não determinada
118	+ +	+ +	+ +	- +	- +	31	Incapacitante	Profundidade	Primária	Dismenorréia	Não	27	1	E + M
123	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	30	Severa	Não	Não	Dismenorréia	Não	0	4	Glândula- estromal

126	+	+	+	+	+	+	+	+	36	Severa	Não	Não	Dismenorréia	Diu cobre + ACO	-	4	Não Determinada
144	+	+	+	+	-	+	-	+	35	Moderada	Não	Não	Dismenorréia	ACO	0	4	E + PD
158	+	+	+	+	-	+	-	+	34	Severa	Profundidade	Primária	Dor no reto na menstruação	ACO	0	4	E + M
159	+	+	+	+	-	+	-	+	42	Moderada	Não	Primária	Dor pélvica acíclica	Diu cobre + ACO	-	4	Não determinada
168	+	+	+	+	-	+	+	+	35	Severa	Profundidade	Secundária	Dor pélvica acíclica	Não	0	4	Não determinada
172	+	+	+	+	-	+	-	+	34	Moderada	Profundidade	Sem tentativa	Dismenorréia	ACO	0	4	E + M
184	+	+	+	+	-	+	-	+	21	Incapacitante	Profundidade	Primária	-	Não	0	4	E + I
187	+	+	+	+	-	+	-	+	34	Incapacitante	Profundidade	Primária	-	ACO	34	4	E + M
195	+	+	+	+	-	+	+	+	50	Moderada	Não	Sem tentativa	Dor intestinal	Não	9,7	2	E + I
202	+	+	+	+	-	+	-	+	22	Incapacitante	Não	Sem tentativa	-	ACO	0	4	E + M
208	+	+	+	+	-	+	+	+	30	Moderada	Profundidade	Primária	Dor entre vagina e ânus	ACO	0	2	Não determinada
242	+	+	+	+	+	+	-	+	35	Severa	Não	Primária	Dismenorréia	ACO + CONDON	25	2	E + M
245	+	+	+	+	-	+	+	+	26	Severa	Profundidade	Sem tentativa	Dismenorréia	ACO + CONDON	0	4	Não determinada
247	+	+	+	+	+	+	-	+	30	Incapacitante	Profundidade	Primária	Dismenorréia	ACO	0	4	E + I
250	+	+	+	+	-	+	+	+	45	Moderada	Profundidade	Não	Dor no reto	CONDON	0	4	E + M
259	+	+	+	+	-	+	+	+	32	Moderada	Não	Secundária	Dismenorréia	ACO + CONDON	0	4	E + M
279	+	+	+	+	-	+	+	+	37	Severa	Não	Sem tentativa	Dismenorréia	ACO	0	4	E + I

280	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	33	Ausente	Profundidade	Primária	Abdomen inchado	Não	0	2	E + I
282	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	36	Incapacitante	Profundidade	Primária	-	DIU + Progesterona	0	4	E + M
290	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	33	Ausente	Profundidade	Primária	Dor na bexiga para urinar	Lupron	100	3	E + M
302	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	30	Moderada	Profundidade	Sem tentativa	Dismenorréia e Sangramento	Injetável mensal + ACO	31	3	E + I
308	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	43	Moderada	Profundidade	Não	Dismenorréia	Não	0	1	E + I
311	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	27	Incapacitante	Profundidade	Primária	Dismenorréia e sangramento	Não	0	4	E + M
324	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	38	Moderada	Profundidade	Sem tentativa	-	ACO	0	4	E + M
328	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	24	Severa	Não	Sem tentativa	Dismenorréia e mal estar	ACO	0	4	E + M
342	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	45	Severa	Profundidade	Não	Dismenorréia	Não	0	1	E + I
343	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	38	Moderada	Profundidade	Sem tentativa	Dismenorréia	CONDON	0	4	E + M
345	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	39	Moderada	Não	Não	Dismenorréia	ACO	0	4	E + M
347	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	40	Moderada	Não	Primária	Dismenorréia	Diu cobre + ACO	0	2	E + M
351	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	37	Leve	Profundidade	Primária	Infertilidade	ACO	0	1	E+M
374	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	31	Incapacitante	Penetração	Primária	Dismenorréia	Primolut-NOR	0	4	E + M

EU, endométrio eutópico; EC, endométrio ectópico; +, presença de banda após eletroforese em gel de acrilamida e coloração com nitrato de prata; -, ausência de banda após eletroforese em gel de acrilamida e coloração com nitrato de prata; ACO, anticoncepcional; NR, não referido; E, padrão estromal; M, padrão glandular misto; I, padrão glandular indiferenciado; PD, padrão glandular pouco diferenciado. *ESR1* (Estrógeno receptor 1), *ESR2* (Estrógeno receptor 2), *PGR* (Progesterone receptor); * *ASRM*, American Society for Reproductive Medicine, ** Abrão et al, 2003.

Referências Bibliográficas

- Kang SC, Lee BM. DNA methylation of estrogen receptor alpha gene by phthalates. *J Toxicol Environ Health A*. 10: 1995-2003, 2005.
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 10: 515-27, 2006.
- Pilat MJ, Schwab ED, Yao KL, Pienta KJ. Examination of the DNA methylation properties in nontumorigenic and tumorigenic breast epithelial cell lines. *Anticancer Res*. 18: 2575-82, 1998.
- Sasaki M, Tanaka Y, Perinchery G, Dharia A, Kotcherguina I, Fujimoto S, Dahiya R. Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 6: 384-90, 2002.
- Tang B, Peng ZH, Jiang J. [The synergistic inhibitory effect of 5-aza-2-deoxycytidine and Tamoxifen on estrogen receptor alpha negative breast cancer cell lines in vitro]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 43: 1545-9, 2005.