

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

**CÁSSIA GISELE TERRASSANI SILVEIRA**

## **ALTERAÇÕES GENÔMICAS NA ENDOMETRIOSE**

*Tese apresentada ao Instituto de  
Biociências de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
– UNESP, como requisito à obtenção do  
título de Doutor em Ciências Biológicas –  
Área de concentração: Genética.*

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Silvia Regina Rogatto**

**Botucatu**

**2011**

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

Silveira, Cássia Gisele Terrassani.

Alterações genômicas na endometriose / Cássia Gisele Terrassani Silveira.  
- Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista, 2011

Orientador: Silvia Regina Rogatto

Capes: 20200005

1. Endometriose. 2. Microarranjos de DNA. 3. Células - Tronco.

Palavras-chave: Células-tronco; Endometriose; Genética; Hibridação  
genômica comparativa de alta resolução; Imuno-histoquímica; Microarranjos  
de DNA.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”

*Albert Einstein*

**Dedicatória**



*À minha amada família, em especial aos meus pais Judite e Antonio,  
pelo carinho e amor incondicional.*

## Agradecimentos



## **Agradecimentos**

### ***A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Regina Rogatto***

Pela oportunidade, carinho, confiança e pelos conhecimentos transmitidos durante esses nove anos. Você é exemplo de determinação e força de vontade. Sou e sempre serei infinitamente grata por toda sua dedicação comigo! Muito obrigada!

***Ao Dr. Mauricio Simões Abrão e equipe,***

***À Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues,***

***À Dra. Renata de Almeida Coudry,***

***À Dra. Renée Laufer Amorim,***

***À Dra. Sandra Aparecida Drigo Linde,***

***À Dra. Cláudia Aparecida Rainho.***

Obrigada pela paciência e valiosos auxílios essenciais para a realização desse projeto.

***À Biblioteca e Pós-graduação-IBB, UNESP, Botucatu-SP***

Por estarem sempre prontos a ajudar, muito obrigada!

***Ao Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, SP***

***Ao Centro Intenacional de Pesquisa e Ensino (CIPE) e Departamento de Anatomia Patológica, Hospital AC Camargo, São Paulo-SP***

Pela contribuição e assistência necessária para execução deste trabalho.

***À Fapesp pelo suporte financeiro.***

***À todos os integrantes e ex-integrantes***

***do Laboratório Neogene:***

***Ana, Anderson, André, Ariane, Carlos, Carol, Deborah, Eliane, Eloísa, Fábio, Fabíola, Fernanda, Francine, Georgia, Graziela, Haydée, Hellen, Juan, Julia, Livia, Luciana, Márcia, Mateus, Mateus, Miriam, Priscila, Renata Bueno, Renata Canevari, Renée, Rodrigo, Rogério, Sandra e Sara.***

***e do CIPE – Hospital A. C. Camargo:***

***Felipe, Gustavo, Iara, Juliano, Luciane, Nair, Vera e Yukie,***

Meus sinceros agradecimentos a todos vocês que sempre presentes de diferentes maneiras tornaram todos os momentos mais alegres. Pensando no que dissemos, fizemos e sentimos, podemos perceber que a história que construímos juntos foi verdadeiramente grandiosa e inesquecível.

Obrigada por terem aparecido na minha vida e pela grande amizade!

“Em cada porto e despedida dessa vida esqueci meu coração batendo lá...”

*Pe. Fábio de Melo*

***A Deus***

Que é fonte de tudo, dando-nos segurança, coragem e confiança em todos os nossos empreendimentos e dissolvendo com sua proteção todos os obstáculos.

***Aos meus pais Judite e Antonio, e meus irmãos Fábio e Sérgio***

Com sustentação moral, amorosa e afetiva de uma família maravilhosa, encontrei forças para chegar até aqui e ir adiante.

***Ao meu esposo André***

Pela compreensão, incentivo, carinho e amor! Obrigada por me fazer acreditar que sou capaz e prosseguir comigo ao encontro dos meus sonhos!

***À minha avó Rosa (in memoriam)***

Meu eterno exemplo de bondade, força e superação.

***A toda minha família***

De maneiras diferentes e especiais tornaram esta caminhada mais alegre e serena.

***Á todos meus amigos, em especial às amigas Camila e Daniela***

Pelos gestos de carinho, atenção e delicadeza que nos fazem perceber o quanto são especiais.

**Resumo**



## RESUMO

A endometriose (EDT) é uma doença ginecológica crônica e heterogênea considerada um importante problema de saúde pública. As metodologias de Hibridação Genômica Comparativa de Alta resolução (HR-CGH) e CGH array (aCGH) são ferramentas importantes para a triagem de alterações genômicas em diferentes lesões endometriídes. No presente estudo, as análises de HR-CGH foram realizadas em 20 amostras de EDT fixadas em formalina e em blocos de parafina, de diferentes sítios e tipos histológicos, obtidas de oito pacientes submetidas à laparoscopia (**Grupo I**). Os componentes estromais e epiteliais foram isolados por microdissecção a laser. As amostras de endométrio típico de três pacientes apresentaram perfis genômicos normais. Nos tecidos ectópicos, foi observada uma média de 68 regiões alteradas por caso. Análises comparativas entre os componentes estromais e epiteliais demonstraram alta frequência de alterações genômicas comuns. As perdas foram mais prevalentes e envolveram principalmente os cromossomos 3p, 5q, 7p, 9p, 11q, 16q, 18q e 19q. A comparação entre os perfis de alteração de lesões de diferentes localizações derivadas da mesma paciente revelou a predominância de regiões comuns envolvidas em perdas e ganhos. Baseado nestes resultados foi realizada a análise de expressão protéica de sete marcadores de células-tronco pela metodologia de imuno-histoquímica. A maioria das amostras apresentou expressão positiva dos marcadores CD9, CD34, c-Kit e Oct-4 em células isoladas do epitélio glandular e/ou células estromais. A presença de alterações genômicas comuns nos componentes estromal e epitelial de diferentes lesões sugere que a EDT apresenta uma origem monoclonal e a expressão positiva de marcadores de células-tronco sugere fortemente o envolvimento de células progenitoras endometriais na EDT. Adicionalmente, a técnica de aCGH foi realizada em 18 amostras a fresco de EDT intestinal profunda (**Grupo II**) utilizando plataformas de oligonucleotídeos de 4x44k (Agilent). Os dados da aCGH foram analisados pelo programa *Nexus version 5.0*, (Biodiscovery) e a análise de funções moleculares, vias celulares e redes gênicas foi realizada utilizando o programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (Ingenuity Systems). As variações no número de cópias (CNV) do DNA foram verificadas em todos os casos e incluíram principalmente ganhos em 3p, 5q, 6q, 10q, 13q, 14q, 17p e 22q, como também perdas em 10q, 11q, 17q, 20q e 22q. O agrupamento hierárquico não-supervisionado revelou dois principais grupos baseados no perfil de alterações genômicas: o *cluster 1* (7 casos), que apresentou um maior número de alterações genômicas, e o *cluster 2*

(11 casos). Esse agrupamento teve associação estatisticamente significativa com a alteração estrutural presente em 22q13.33 ( $P = 0,008$ ), a qual foi associada a ganhos nos casos do *cluster* 1 e perda nos casos do *cluster* 2. Os genes envolvidos nas regiões de perdas e ganhos estavam associados principalmente com o desenvolvimento, movimento e sobrevivência celular, bem como sinalização celular. Os genes alterados se correlacionaram com importantes vias canônicas previamente descritas, principalmente as vias de sinalização de *ILK* (*integrin-linked kinase*), de quimiocinas e *IL-17*, nas quais foram observadas rotas biológicas distintas entre os dois grupos de EDT intestinal. Além disso, as seqüências alteradas foram relacionadas a duas principais redes gênicas envolvidas nos processos de motilidade e proliferação celular e resposta inflamatória. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo de triagem de alterações genômicas em alta resolução nas lesões endometrióides intestinais infiltrativas. Nossos achados podem sugerir a existência de diferentes rotas biológicas envolvidas no desenvolvimento da EDT intestinal profunda.

**Abstract**



## ABSTRACT

Endometriosis (EDT) is a chronic and heterogeneous gynecological disease increasingly recognized as an important women's health issue. High Resolution Comparative Genomic Hybridization (HR-CGH) and array-CGH (aCGH) methods are potential tools for screening of genomic imbalances in distinct EDT lesions. In this study, HR-CGH was performed on 20 formalin-fixed paraffin-embedded EDT samples from different anatomical sites and histological types obtained from eight patients undergoing laparoscopy (**Group 1**). Stromal and epithelial components from each sample were laser microdissected. Eutopic endometrium from three patients was also analyzed and presented normal genomic pattern. In ectopic tissues, an average of 68 genomic imbalances was detected per sample. The comparison between stroma and epithelia showed the prevalence of common genomic alterations. DNA losses were more frequently detected and involved mainly 3p, 5q, 7p, 9p, 11q, 16q, 18q and 19q. Interestingly, the comparison among genomic profiles of distinct endometriotic lesions from particular patients also showed a high frequency of common losses and gains. Based on these findings, we also evaluated the expression of seven stemness-related markers by immunohistochemistry. Positive immunostaining for CD9, CD34, c-kit and Oct-4 markers was detected in isolated epithelial and/or stromal cells in majority of analyzed samples. The presence of common genomic alterations in stromal and epithelial cells from different sites and the expression of stemness-related markers suggested that EDT presents a clonal proliferation like in tumors and it may have a stem cell origin. Additionally, we investigated copy number variation (CNV) by high resolution array-CGH (aCGH) in 18 fresh microdissected infiltrating EDT lesions (**Group II**) using 4x44K oligonucleotide platforms (Agilent). aCGH data were analyzed by Nexus version 5.0 software (Biodiscovery) and molecular functions, pathways and network analysis were determined using Ingenuity Pathways Analysis (IPA) software (Ingenuity Systems). Genomic alterations were observed in all cases and included recurrent gains at 3p, 5q, 6q, 10q, 13q, 14q, 17p and 22q; and losses at 10q, 11q, 17q, 20q and 22q. Unsupervised hierarchical clustering revealed two major groups based on the genomic alteration profile: cluster 1, which showed a higher number of genomic alterations, and cluster 2. Interestingly, this clustering was statistically associated with structural alteration at 22q13.33 ( $P=0.008$ ), which presented gain at cluster 1 and loss at cluster 2. Gene functions were mainly related to cell signaling and cellular development, cellular maintenance and motility. The associated canonical pathways included integrin-linked kinase (ILK), chemokine and interleukine 17 (IL-17) signaling. Particularly,

different signaling pathways were altered in clusters 1 and 2 suggesting the presence of distinct biological routes related to intestinal DIE pathogenesis. In addition, two relevant gene networks were verified and related to cell proliferation and motility, and inflammatory response. To our knowledge, this is the first genome-wide study using a high throughput approach in intestinal DIE. The findings revealed different biological routes in these lesions suggesting two different molecular events associated with DIE development.

## Lista de Figuras



## LISTA DE FIGURAS

|                  |                                                                                                                                                                  |    |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b>  | Localização hipotética das células-tronco epiteliais e estromais presentes na camada basal do endométrio.....                                                    | 10 |
| <b>Figura 2</b>  | Relação entre as células endometriais formadoras de colônias e o modelo hierárquico da diferenciação de células-tronco.....                                      | 12 |
| <b>Figura 3</b>  | Modelo proposto para a implantação tópica e ectópica das células-tronco endometriais e subsequente desenvolvimento das lesões endometrióides.....                | 15 |
| <b>Figura 4</b>  | Microdissecção a laser de endométrio ectópico do caso FC03-0519, presente no ovário.....                                                                         | 40 |
| <b>Figura 5</b>  | Representação esquemática da metodologia da SCOMP.....                                                                                                           | 43 |
| <b>Figura 6</b>  | Caracterização das amostras de EDT do Grupo I que foram avaliadas pela metodologia de HR-CGH.....                                                                | 47 |
| <b>Figura 7</b>  | Fotomicrografias das lesões dos casos 157 e 255 antes e após a microdissecção.....                                                                               | 50 |
| <b>Figura 8</b>  | Eletroforese em gel de agarose 0.8% de DNA genômico extraído (200ng) das amostras microdissecadas.....                                                           | 52 |
| <b>Figura 9</b>  | Padrão de marcação da HR-CGH para a amostra de EDT em sigmóide do caso FC03-1965 microdissecada no componente epitelial e marcada pela metodologia de SCOMP..... | 56 |
| <b>Figura 10</b> | Caracterização das regiões mínimas alteradas identificadas pela HR-CGH ( $p < 0,05$ ) no estroma e epitélio de EDT de diferentes sítios.....                     | 59 |
| <b>Figura 11</b> | Comparação das regiões mínimas alteradas identificadas pela                                                                                                      | 61 |

HR-CGH ( $p < 0,05$ ) no estroma e epitélio de duas amostras de EDT de diferentes sítios (ovário e sigmóide) do caso FC01-0189.

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 12</b> | Comparação das regiões mínimas alteradas identificadas pela HR-CGH ( $p < 0,05$ ) no estroma e epitélio de três amostras de EDT de diferentes sítios (bexiga, reto e retossigmóide) do caso FC03-0248.....                                                          | 62 |
| <b>Figura 13</b> | Comparação das regiões mínimas alteradas identificadas pela HR-CGH ( $p < 0,05$ ) no estroma e epitélio de duas amostras de EDT de diferentes sítios (ovário e sigmóide) do caso FC03-0519.....                                                                     | 63 |
| <b>Figura 14</b> | Comparação das regiões mínimas alteradas identificadas pela HR-CGH ( $p < 0,05$ ) no estroma e epitélio de duas amostras de EDT de diferentes sítios (vesical e sigmóide) do caso FC03-1965.....                                                                    | 64 |
| <b>Figura 15</b> | Comparação das regiões alteradas identificadas pela HR-CGH ( $p < 0,05$ ) no estroma e epitélio de quatro amostras de EDT de diferentes sítios (ovário, inter-sacro, para-tubárea e sigmóide – este último com três diferentes focos de EDT) do caso FC04-1080..... | 65 |
| <b>Figura 16</b> | Comparação das regiões mínimas alteradas identificadas pela HR-CGH ( $p < 0,05$ ) no estroma e epitélio de três amostras de EDT de diferentes sítios (retro-cervical, ligamento redondo e retossigmóide) do caso FC04-1132.....                                     | 66 |
| <b>Figura 17</b> | Caracterização das regiões mínimas alteradas identificadas pela HR-CGH ( $p < 0,05$ ) no componente epitelial de EDT de intestino e de outros sítios.....                                                                                                           | 68 |
| <b>Figura 18</b> | Caracterização das regiões mínimas alteradas identificadas pela HR-CGH ( $p < 0,05$ ) no componente estromal de EDT de intestino e de outros sítios.....                                                                                                            | 70 |

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 19</b> | Padrões de expressão dos marcadores CD9, CD34, CD117/c-kit e Oct-4 observada em células endometriais do epitélio glandular e/ou do estroma, com intensidade e extensão variável entre as amostras.....                                                                                    | 77 |
| <b>Figura 20</b> | Representação gráfica do número de alterações em todo o genoma (B) e por cromossomo (A) encontrados nas 18 lesões de EDT intestinal profunda avaliadas pela metodologia de aCGH.....                                                                                                      | 80 |
| <b>Figura 21</b> | Ideograma ilustrando as alterações genômicas encontradas nas 18 lesões de EDT intestinal avaliadas pela técnica de aCGH (A) e representação das frequências de alterações em todo o conjunto cromossômico (Cromossomos 1 ao X) (B).....                                                   | 81 |
| <b>Figura 22</b> | Agrupamento hierárquico não supervisionado realizado para 18 lesões de EDT intestinal baseado no perfil de alterações genômicas encontrado em cada caso.....                                                                                                                              | 85 |
| <b>Figura 23</b> | Genes diferencialmente expressos entre as 18 amostras de EDT intestinal avaliadas e associados às doenças (A) e funções celulares e moleculares (B) que apresentaram os maiores <i>scores</i> .....                                                                                       | 87 |
| <b>Figura 24</b> | Vias canônicas correlacionando com os genes envolvidos em perdas e ganhos presentes em > 20% das lesões de EDT intestinal e que apresentaram os maiores <i>scores</i> (A) e porcentagem de genes envolvidos em perdas (verde) e ganhos (vermelho) presentes em cada via canônica (B)..... | 89 |
| <b>Figura 25</b> | Representação esquemática das vias canônicas mais relevantes associadas com genes alterados em ≥20% das lesões DIE.....                                                                                                                                                                   | 90 |
| <b>Figura 26</b> | Representação esquemática de duas redes baseadas nos genes envolvidos em ganhos e perdas genômicas na EDT intestinal com maiores <i>scores</i> de alteração (27 e 9).....                                                                                                                 | 94 |

## Lista de Tabelas



## LISTA DE TABELAS

|                  |                                                                                                                                                       |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b>  | Informações clínicas das pacientes e caracterização histopatológicas das lesões endometrióides dos Grupos I e II avaliadas neste estudo.....          | 32 |
| <b>Tabela 2</b>  | Características dos anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica nas amostras do Grupo I.....                                    | 49 |
| <b>Tabela 3</b>  | Regiões mínimas de perdas e ganhos genômicas de diferentes lesões de EDT, considerando a análise separada dos componentes epiteliais e estromais..... | 57 |
| <b>Tabela 4</b>  | Regiões mínimas exclusivas de perdas e ganhos genômicos de cada componente celular (estroma e epitélio) de diferentes lesões de EDT.....              | 60 |
| <b>Tabela 5</b>  | Regiões mínimas de perdas e ganhos genômicos detectadas no epitélio glandular de lesões endometrióides em intestino e outros sítios.....              | 69 |
| <b>Tabela 6</b>  | Regiões mínimas de perdas e ganhos genômicos detectados no estroma de lesões endometrióides em intestino e outros sítios....                          | 71 |
| <b>Tabela 7</b>  | Padrões de expressão das proteínas CD9, CD34, CD117/c-Kit e Oct-4 em diferentes lesões endometrióticas e endométrio tóxico.                           | 74 |
| <b>Tabela 8</b>  | Alterações genômicas encontradas em mais de 20% das 18 amostras de EDT intestinal avaliadas.....                                                      | 82 |
| <b>Tabela 9</b>  | Relação dos genes alterados nas cinco vias canônicas que apresentaram os maiores scores (6,43 a 1,09).....                                            | 89 |
| <b>Tabela 10</b> | Descrição dos genes envolvidos nas principais redes canônicas detectados nas lesões de EDT intestinal.....                                            | 93 |

## **Lista de Siglas e Abreviaturas**



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|                  |                                                                                                                                                      |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EDT              | <i>Endometriose</i>                                                                                                                                  |
| HR-CGH*          | <i>Hibridação Genômica Comparativa de Alta resolução, do inglês High-Resolution Comparative Genomic Hybridization</i>                                |
| aCGH*            | <i>Array Comparative Genomic Hybridization</i>                                                                                                       |
| IPA*             | <i>Ingenuity Pathways Analysis</i>                                                                                                                   |
| CNV*             | <i>Variações no Número de Cópias, do inglês Copy Number Variation</i>                                                                                |
| ILK*             | <i>Integrin-linked Kinase</i>                                                                                                                        |
| ESHRE*           | <i>European Society of Human Reproduction and Embriology</i>                                                                                         |
| ASRM*            | <i>American Society for Reproductive Medicine</i>                                                                                                    |
| TA*              | <i>Proliferating Transit Amplifying Cells</i>                                                                                                        |
| LOH*             | <i>Perda de Heterozigose, do inglês Loss of Heterozygosity</i>                                                                                       |
| FISH*            | <i>Hibridação in situ Fluorescente, do inglês Fluorescent in situ Hybridization</i>                                                                  |
| CGH*             | <i>Hibridação Genômica Comparativa, do inglês Comparative Genomic Hybridization</i>                                                                  |
| DNA*             | <i>Deoxiribonucleic Acid</i>                                                                                                                         |
| miRNA*           | <i>Micro RNA</i>                                                                                                                                     |
| RNA*             | <i>Ribonucleic Acid</i>                                                                                                                              |
| BAC*             | <i>Bacterial Artificial Chromosome</i>                                                                                                               |
| RT-qPCR*         | <i>Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa via Transcriptase Reversa, do inglês Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> |
| EST*             | <i>Expressed Sequence Tags</i>                                                                                                                       |
| FFEP             | <i>Fixado em Formalina e Embebido em Parafina</i>                                                                                                    |
| LCM*             | <i>Microdissecção a Laser, do inglês Laser-Capture Microdissection</i>                                                                               |
| PCR*             | <i>Polymerase Chain Reaction</i>                                                                                                                     |
| SCOMP*           | <i>Single Cell Comparative Genomic Hybridization</i>                                                                                                 |
| dNTP*            | <i>Deoxynucleoside Triphosphate</i>                                                                                                                  |
| dUTP*            | <i>Deoxyuridine triphosphate</i>                                                                                                                     |
| FITC*            | <i>Fluoresceína Isotiocianato, do inglês Fluorescence Isothiocyanate</i>                                                                             |
| DAPI*            | <i>4',6-Diamidino-2-phenylindole</i>                                                                                                                 |
| IHQ              | <i>Imuno-histoquímica</i>                                                                                                                            |
| PBS*             | <i>Phosphate Buffered Saline</i>                                                                                                                     |
| BSA*             | <i>Albumina Bovina, do inglês Bovine Serum Albumin</i>                                                                                               |
| NaN <sub>3</sub> | <i>Azida Sódica</i>                                                                                                                                  |
| DAB              | <i>Diaminobenzidina</i>                                                                                                                              |
| SDS*             | <i>Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês Sodium Dodecyl Sulphate</i>                                                                                   |

|      |                                                        |
|------|--------------------------------------------------------|
| Cy3* | <i>Cyanine 3</i>                                       |
| Cy5* | <i>Cyanine 5</i>                                       |
| TE   | <i>Tampão Tris-EDTA</i>                                |
| IPA  | <i>Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems)</i> |
| EU   | <i>Endométrio tópico</i>                               |
| SE   | <i>Sigmóide – componente estromal</i>                  |
| SEG  | <i>Sigmóide – componente epitelial</i>                 |
| RSE  | <i>Retossigmóide – componente estromal</i>             |
| RSEG | <i>Retossigmóide – componente epitelial</i>            |
| OE   | <i>Ovário – componente estromal</i>                    |
| OEG  | <i>Ovário – componente epitelial</i>                   |
| VE   | <i>Vesical – componente estromal</i>                   |
| IE   | <i>Intersacro – componente estromal</i>                |
| IEG  | <i>Intersacro – componente epitelial</i>               |
| PE   | <i>Paratubárea – componente estromal</i>               |
| PEG  | <i>Paratubárea – componente epitelial</i>              |
| BEG  | <i>Bexiga – componente epitelial</i>                   |
| RCE  | <i>Retrocervical – componente estromal</i>             |
| RCEG | <i>Retrocervical - componente epitelial</i>            |
| LRE  | <i>Ligamento redondo – componente estromal</i>         |
| LREG | <i>Ligamento redondo – componente epitelial</i>        |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i>   |

\* siglas ou abreviaturas derivadas do inglês

## Sumário



## SUMÁRIO

|          |                                                                                                          |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                  | <b>1</b>  |
| 1.1      | O endométrio eutópico e ectópico de portadoras de EDT .....                                              | 6         |
| 1.2      | Patogênese da EDT .....                                                                                  | 6         |
| 1.3      | Células-tronco do endométrio.....                                                                        | 9         |
| 1.3.1    | Caracterização de células-tronco endometriais.....                                                       | 11        |
| 1.3.2    | Células tronco e a origem do endométrio ectópico .....                                                   | 13        |
| 1.4      | Endometriose e tumores associados.....                                                                   | 16        |
| 1.5      | Genética da endometriose.....                                                                            | 19        |
| 1.5.1    | História familiar .....                                                                                  | 19        |
| 1.5.2    | Alterações genômicas na endometriose.....                                                                | 20        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>                                                                                   | <b>29</b> |
| 2.1      | Gerais .....                                                                                             | 29        |
| 2.2      | Específicos .....                                                                                        | 29        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                           | <b>30</b> |
| 3.1      | Caracterização das amostras. ....                                                                        | 30        |
| 3.2      | Metodologias .....                                                                                       | 39        |
| 3.2.1    | Grupo I.....                                                                                             | 39        |
| 3.2.1.1  | Microdissecção a laser das amostras em blocos de parafina .....                                          | 39        |
| 3.2.1.2  | Extração do DNA .....                                                                                    | 40        |
| 3.2.1.3  | SCOMP ( <i>Single Cell Comparative Genomic Hybridization</i> ) .....                                     | 41        |
| 3.2.1.4  | Hibridação genômica comparativa - CGH .....                                                              | 43        |
| 3.2.1.5  | Análise de expressão protéica de marcadores de célula-tronco pela metodologia de imuno-histoquímica..... | 48        |
| 3.2.2    | Grupo II.....                                                                                            | 49        |
| 3.2.2.1  | Microdissecção manual .....                                                                              | 49        |
| 3.2.2.2  | Obtenção do DNA genômico .....                                                                           | 51        |
| 3.2.2.3  | Experimento da aCGH.....                                                                                 | 52        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS .....</b>                                                                                  | <b>55</b> |
| 4.1      | Análise das alterações genômicas pela HR-CGH - Grupo I.....                                              | 55        |
| 4.2      | Análise de expressão protéica de marcadores de célula-tronco .....                                       | 72        |
| 4.3      | Análise de alterações genômicas pela aCGH - Grupo II.....                                                | 78        |

|          |                                               |            |
|----------|-----------------------------------------------|------------|
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO .....</b>                        | <b>95</b>  |
| 5.1      | Grupo I - EDT em diferentes sítios .....      | 95         |
| 5.2      | Grupo II - EDT infiltrativa em intestino..... | 117        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>                       | <b>130</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>       | <b>132</b> |

## **ANEXOS**

- Anexo 1** Caracterização das regiões mínimas alteradas por HR-CGH ( $p < 0,05$ ) em cada uma das amostras de endometriose (EDT) de diferentes sítios (Grupo I).
- Anexo 2** Representação gráfica das alterações detectadas em mais de 20% dos casos de EDT intestinal avaliados neste estudo.

## **ARTIGOS**

- Artigo 1** The potential role of stem cells in endometriosis suggested by chromosomal imbalances and stemness-related markers protein expression in lesions from different anatomical sites.
- Artigo 2** Genomic imbalances on 22q13.33 define two biological routes in intestinal deep endometriosis by array-based CGH.

## Introdução



## 1. INTRODUÇÃO

Descrita pela primeira vez por Rokitansky em 1860, a endometriose (EDT) é uma doença ginecológica complexa classicamente caracterizada pela presença de células endometriais estromais e epiteliais em localizações extra-uterinas (acometendo principalmente ovários, peritônio e outros órgãos pélvicos) e extra-pélvicas (incluindo o trato intestinal, ureter, entre outros) (Wheeler, 1989; Eskenazi e Warner, 1997; Giudice, 2010). De acordo com a *European Society of Human Reproduction and Embriology* (ESHRE), conceitua-se esta enfermidade como a presença de tecido endometrial em localização extra-uterina o qual induz uma reação inflamatória crônica (Kennedy et al., 2005).

A EDT compreende um amplo espectro de lesões que podem comprometer qualquer tecido, variando em severidade e inabilidade. Entretanto, a maioria das lesões localiza-se na escavação pélvica, mais precisamente no peritônio e nos ovários. A doença é polimórfica, podendo se apresentar na forma de implantes superficiais nos ovários e no peritônio, (sendo denominada como EDT superficial); cistos ovarianos situados na profundidade das gônadas (endometriomas); bem como lesões nodulares, que infiltram a superfície peritonial por mais de cinco milímetros de profundidade (EDT profunda ou infiltrativa) (Cornillie et al., 1990; Nisolle e Donnez, 1997; Chapron et al., 2003).

Particularmente, os endometriomas representam aproximadamente 93% das EDTs que acometem o ovário e podem atingir tamanhos superiores a dez centímetros de diâmetro. O endometrioma é formado pelo acúmulo de debris menstruais nos cistos de inclusão ovarianos, resultando em progressiva invaginação do córtex ovariano (Brosens et al., 2004). O comportamento da doença que se desenvolve exclusivamente nesse local

apresenta características distintas da peritoneal ou de septo reto-vaginal (revisado em Dias Jr. et al., 2006).

As EDTs infiltrativas são lesões tipicamente multifocais diagnosticadas em aproximadamente 30%-40% das mulheres afetadas e estão freqüentemente associadas com comportamento agressivo (Abrão et al., 2003). As estruturas mais comumente comprometidas pela doença profunda são em ordem decrescente de freqüência: a região retrocervical (tórus uterino e ligamentos útero-sacros); o reto-sigmóide; a vagina e a bexiga (Jenkins et al., 1986; revisado em Hsu et al., 2010). Em qualquer desses sítios, há uma tendência a fibrose e pode haver características histológicas semelhantes à adenomiose externa (revisado em Fraser, 2008). Os mecanismos patogênicos envolvidos no desenvolvimento das lesões infiltrativas não estão completamente elucidados, mas acredita-se que a progressão dessa doença esteja associada a um quadro inflamatório permanente e severo (revisado em Vercellini et al., 2009).

As lesões endometrióticas do peritônio, ovário e septo reto-vaginal podem ser subdivididas em três tipos distintos de acordo com a fase de desenvolvimento da doença. As lesões vermelhas são caracterizadas por atividade celular intensa e ampla vascularização, correspondendo aos estágios iniciais da EDT, quando ocorre implantação ectópica do tecido endometrial. O sangramento desse tecido, seguido de novo crescimento tecidual, desencadeia resposta inflamatória ao redor do implante, formando uma escara de aparência escura, sendo então denominada lesão negra. Posteriormente, a fibrose resultante do processo inflamatório e a conseqüente redução de vasos sangüíneos no foco endometriótico determinam o surgimento da denominada lesão branca, caracterizada por um aspecto cicatricial opaco. Esses três tipos de lesões apresentam comportamento clínico variado. Lesões vermelhas têm maior produção de prostaglandina e, assim, podem acarretar sintomas mais severos de dor. Com a evolução

do processo, o quadro tende a se amenizar e as lesões brancas podem permanecer em estado latente (Nisolle e Donnez, 1997; Carvalho e Abrão, 2000; Dias Jr. et al., 2006).

Embora uma grande parcela das portadoras de EDT seja assintomática, os sintomas ginecológicos clássicos incluem a dispareunia, dismenorréia, dor pélvica e infertilidade (Dias Jr et al., 2006). Quando há comprometimento intestinal e urinário, as pacientes podem referir dor à evacuação e durante micção, respectivamente. As mudanças inflamatórias e fibróticas recorrentes nas lesões são apontadas como as responsáveis pelos sintomas, embora seja paradoxal a relação entre a sua intensidade e o estadiamento da doença (Clement, 2002; Chapron et al., 2003; Abrão et al., 2007). Nos casos de doença mais grave frequentemente se observam extensas adesões pélvicas, que podem levar à dor e infertilidade. Nas pacientes com dor, a intervenção cirúrgica leva à diminuição dos sintomas, embora aproximadamente 75% das pacientes apresentem recorrência dos sintomas em dois anos (revisado em Giudice e Kao, 2004; Giudice, 2010).

A exata incidência e a prevalência da EDT não foram determinadas. Poucos estudos epidemiológicos foram conduzidos especificamente para este fim, devido principalmente às complexidades relacionadas aos diagnósticos clínico, cirúrgico e anatomopatológico, os quais variam muito de acordo com a população estudada.

Estima-se que a EDT ocorra em até 15% de todas as mulheres em idade reprodutiva, em cerca de 20% das pacientes com dor pélvica crônica, em 50% das pacientes com história de infertilidade, e em 40% a 60% das pacientes com dismenorréia (Eskenazi e Warner, 1997; Missmer e Cramer, 2003; Fauconnier e Chapron, 2005; Giudice, 2010). Esta doença também pode ser observada em mulheres na pós-menopausa (menos de 5% dos casos) e em adolescentes (até 10% dos casos), especialmente naquelas com anomalias Müllerianas, que resultam na obstrução à saída

do fluxo menstrual. Estima-se ainda que 2% a 22% dos casos são assintomáticos (Farquhar, 2000; Valle e Sciarra, 2003).

Considerando-se o sítio acometido, a prevalência da EDT intestinal oscila entre 5,3% a 12% dos casos de EDT. O reto e o sigmóide juntos são responsáveis por 70% a 93% de todas as lesões endometriais intestinais (Abrão et al., 2003; Darai et al., 2005). Quando compromete o reto, pode causar sintomas obstrutivos, dificultando a distinção entre a doença maligna e a inflamatória (Paksoy et al., 2005).

Na EDT, o diagnóstico definitivo ainda depende de métodos invasivos que tornam possíveis a visualização de lesões endometriídes sugestivas e a obtenção de amostra tecidual que confirme, pela análise histológica, essa suspeita (revisado em Hsu et al, 2010).

A laparoscopia ainda permanece como procedimento padrão para o diagnóstico e estadiamento da EDT, este último seguindo os critérios estabelecidos pela *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM, 1997), que classifica a EDT em quatro estadios (forma mínima, leve, moderada e a severa), conforme a extensão ou tamanho das lesões. Assim, a gravidade progride com a quantidade e tamanho dos focos da doença como também pela presença de aderências, sendo o estágio IV o mais avançado (Abrão et al., 2003; Arya e Shaw, 2005; Kennedy et al., 2005).

Após procedimento cirúrgico, o diagnóstico de EDT é confirmado histologicamente, e as lesões endometriais ectópicas são classificadas de acordo com o grau de diferenciação do epitélio glandular e quanto à presença de estroma em EDT de:

- *Padrão estromal*: presença de estroma morfolologicamente similar ao do endométrio tópico 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 típico nas seguintes formas de apresentação:

- *Bem diferenciada*: células epiteliais têm morfologia indistinguível dos endométrios típicos nas diferentes fases do ciclo;
- *Indiferenciada*: composto por células epiteliais não endometrióides, podendo apresentar-se como epitélio aplainado ou cuboidal baixo, assemelhando-se ao mesotélio do revestimento peritoneal, ou como epitélio Mülleriano distinto do endometrióide, como seroso ou mucinoso.
- *Diferenciação mista*: presença, na mesma localização, de padrões glandulares diferenciados e indiferenciados.

Abrão et al. (2003) sugeriram que esses dados histológicos podem ser descritos de acordo com a similaridade com o endométrio típico, e que existe a possibilidade de relacionar tais informações com a classificação proposta pela ASRM (1997), bem como com o prognóstico.

Adicionalmente, Kamergorodsky et al. (2009) avaliaram a correlação entre o padrão de diferenciação histológica de 271 biópsias de EDT e o grau de infiltração da lesão. Os autores demonstraram que as lesões endometrióides indiferenciadas são mais invasivas, possivelmente pelo fato do tecido morfologicamente alterado ser incapaz de responder aos sinais inibidores de proliferação do microambiente peritoneal. Em um estudo anterior, Abrão et al. (2003) também evidenciaram uma significativa correlação entre o grau histológico com a classificação proposta pela ASRM (1997), bem como com o prognóstico.

Devido à variabilidade nos aspectos clínicos e morfológicos observados nas lesões endometrióides ectópicas, tem sido discutido atualmente se as manifestações da EDT são categorias diferentes de uma única doença, se são doenças distintas, mas com

características relacionadas, ou se representam várias formas de processos patofisiológicos que determinam fenótipos distintos (Barlow e Kennedy, 2005).

### **1.1. O endométrio eutópico e ectópico de portadoras de EDT**

Os tecidos endometriais ectópicos são compostos de células constantemente ativas que respondem a hormônios e drogas de maneira semelhante ao endométrio eutópico. Desta forma, os implantes endometrióides estão sujeitos às alterações que se manifestam durante o ciclo menstrual e o sangramento dessas lesões parece contribuir para o desencadeamento de resposta imunológica local, reações inflamatórias e formação de adesões fibróticas, as quais podem afetar a fisiologia dos órgãos acometidos (Arya e Shaw, 2005).

Em literatura, estudos de expressão gênica têm demonstrado que as alterações primárias presentes nas lesões endometrióides podem ser observadas também no endométrio eutópico de pacientes com EDT. Essas anormalidades funcionais contribuem significativamente para a implantação e a sobrevivência do endométrio ectópico em diferentes localizações extra-uterinas (revisado em Fraser, 2009).

Embora o endométrio eutópico de portadoras e não-portadoras de EDT sejam histologicamente semelhantes, são relatadas diferenças importantes entre esses dois tecidos. Diferentes características bioquímicas e moleculares, incluindo a expressão anormal de esteróides, citocinas, fatores de crescimento e angiogênicos, bem como alterações no processo apoptótico, já foram identificadas no endométrio eutópico de pacientes com EDT e parecem contribuir para o desenvolvimento da doença (revisado em Laudanski et al., 2009).

### **1.2. Patogênese da EDT**

Embora a EDT seja conhecida desde 1860 (Von Rokitansky, 1860), sua etiologia ainda não está completamente elucidada. Alguns estudos sugerem que o risco para desenvolver EDT aumenta com a idade durante o período reprodutivo (Eskenazi e Warner, 1997), indicando que se trata de uma condição estrógeno-dependente (Bulun et al., 2002). Outros fatores etiológicos, em estudo, são as características fisiológicas dos ciclos menstruais, consumo de álcool e cafeína, estatura alta, obesidade (que está relacionada ao aumento de estrógeno) e história familiar (revisado em Giudice, 2010). Existe ainda uma associação com a presença de alterações genéticas e no sistema imunológico. Por esta razão, diferentes estudos têm focado na caracterização de anormalidades moleculares presentes nas células endometrióides e nos órgãos e tecidos peritoniais hospedeiros (revisado em Silveira et al., 2009; Fraser, 2009).

A importância da EDT reflete-se na quantidade crescente de pesquisas publicadas nos últimos anos, destacando-se os estudos sobre a origem do endométrio ectópico (Robboy e Bean, 2010). Neste contexto, diferentes hipóteses etiopatogênicas têm sido propostas.

A menstruação retrógrada é o mecanismo mais conhecido para explicar a presença de células do endométrio em sítios ectópicos. Segundo esta teoria, o implante de células endometriais provém do refluxo de fragmentos da menstruação através das tubas de Falópio para a cavidade abdominal (Sampson, 1925). Como consequência imediata, ocorreria a invasão do epitélio peritoneal e neo-vascularização local associadas à presença de uma resposta imunológica inadequada e anormalidades genéticas, o que garantiria a sobrevivência e o crescimento da lesão (revisado em Siristatidis et al, 2006 e em Tariverdian et al., 2007).

Embora um crescente número de estudos suporte a teoria da menstruação retrógrada como modelo primário de patogênese para a EDT, alguns aspectos desta doença ainda permanecem controversos (revisado em Viganò et al., 2009). Um exemplo

disso é que apenas em 10% das mulheres que apresentam refluxo menstrual para a cavidade peritoneal são diagnosticadas com EDT, sugerindo que outros fatores estejam envolvidos na implantação e proliferação do tecido endometrial nos sítios ectópicos, tais como presença de endométrio eutópico anormal, potencial metaplásico, alterações no microambiente peritoneal, redução da resposta imunológica e aumento da capacidade angiogênica (revisado em Montgomery et al., 2008).

Particularmente, a teoria da metaplasia celômica é atualmente o alvo de diversas pesquisas e atribui as lesões endometrióides como resultado de um processo de metaplasia celular do peritônio pélvico. Alguns estudos demonstraram a potencialidade do tecido peritoneal para o desenvolvimento de lesões pela existência de uma variedade de alterações metaplásicas e neoplásicas nos órgãos do sistema genital feminino. Neste sentido, as lesões podem resultar desta totipotencialidade do sistema Mülleriano, a partir de um processo de transformação celular desse mesotélio em tecido endometrial glandular e estromal (revisado em Missmer e Cramer, 2003). Este mecanismo tem sido freqüentemente aceito para explicar a origem de endometriomas no ovário e nas regiões reto-vaginal, abdominal e torácica (Nisolle e Donnez, 1997; Nap et al., 2004; Brosens, 2004).

Em adição às teorias da menstruação retrógrada e metaplasia, a dispersão linfática de fragmentos do endométrio, a existência de uma predisposição genética e a presença de alterações no sistema imunológico têm sido freqüentemente associadas ao desenvolvimento da EDT. Por esta razão, diferentes estudos têm focado na caracterização de anormalidades moleculares presentes nas células endometrióides e nos órgãos e tecidos peritoniais hospedeiros (revisado em Fraser, 2009).

Recentemente, alguns estudos têm relatado o possível papel das células progenitoras endometriais no estabelecimento e desenvolvimento de lesões endometrióticas em diferentes localizações (revisado em Figueira et al., 2011). No

endométrio humano, essas células são responsáveis pela capacidade regenerativa durante o período proliferativo e apresentam elevado potencial de diferenciação (revisado em Sasson e Taylor, 2008).

### **1.3. Células-tronco do endométrio**

O endométrio é um tecido dinâmico e sofre mais de 400 ciclos de regeneração e diferenciação (revisado em Gargett, 2007). Esses processos são essencialmente influenciados pela ação de hormônios sexuais esteróides circulantes os quais promovem alterações seqüenciais e dinâmicas na morfologia do endométrio e nos perfis bioquímicos e moleculares dos diferentes compartimentos celulares endometriais, incluindo principalmente as camadas de epitélio luminal e glandular, além do tecido conectivo estromal (Sherwin et al., 2006; Gargett et al., 2008).

Assim como em outros tipos de tecido, a arquitetura e função tecidual do trato reprodutivo feminino são mantidas pela relação dinâmica existente entre células epiteliais e por um microambiente constituído pela matriz extracelular e pelos componentes estromais, no qual se incluem os fibroblastos, células endoteliais, adiposas e inflamatórias, além das citocinas e fatores de crescimento (Bhowmick et al., 2004).

No endométrio humano, o epitélio luminal atua como uma camada protetora, enquanto as células epiteliais glandulares são responsáveis pela secreção parácrina e autócrina. Entre outras funções, o componente estromal, por sua vez, participa da promoção do fenótipo epitelial e desempenha uma função regulatória nos processos de desenvolvimento, crescimento e maturação do epitélio (revisado em Arnold et al., 2001). As células estromais diferenciadas expressam baixas quantidades de fatores de crescimento enquanto o epitélio maduro produz altos níveis de citocinas que auxiliam na manutenção da diferenciação do componente estromal, no qual se incluem os

fibroblastos, células endoteliais, adiposas e inflamatórias (revisado em Bhowmick et al., 2004).

Recentemente, tem sido reconhecido que a regeneração do endométrio é mediada por células-tronco ou progenitoras endometriais. Algumas evidências indiretas têm sido compiladas de observações clínicas como também de estudos de cultura celular e clonalidade (revisado em Gargett, 2007; Revel, 2009). A renovação constante da camada endometrial funcional mediada pelo endométrio basal, a ocorrência de uma cinética proliferativa distinta entre o estroma e o epitélio endometrial, e a semelhança morfológica entre os componentes endometriais basais presentes no tecido tópico e ectópico, sugerem a presença de uma população de células-tronco adultas no endométrio basal que é diretamente responsável pela capacidade regenerativa deste tecido (Figura 1) (revisado em Figueira et al., 2011).

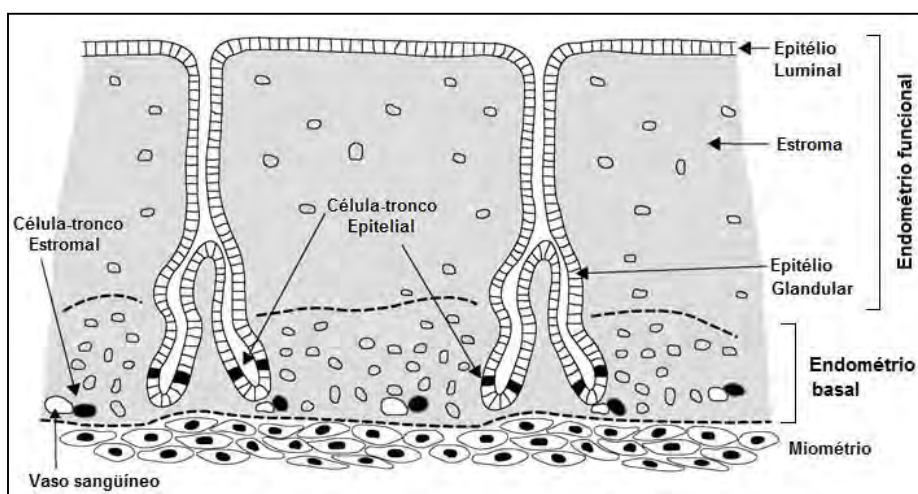


**Figura 1.** Localização hipotética das células-tronco epiteliais e estromais presentes na camada basal do endométrio (Modificado de Gargett et al., 2007).

A primeira evidência sobre a existência de células-tronco endometriais surgiu a partir do estudo de Chan et al. (2004). Os autores relataram a capacidade de clonogenicidade (habilidade de uma célula única iniciar uma colônia celular quando em cultura) das células epiteliais e estromais do endométrio (Chan et al., 2004).

Clonogenicidade é uma propriedade clássica de células-tronco *in vitro*, e que tem sido observada em diferentes tipos de células-tronco adultas. Os autores observaram também que células estromais e epiteliais do endométrio humano foram capazes de formar pequenas e grandes colônias: as grandes colônias são originadas por células-tronco enquanto que as pequenas colônias surgem a partir de células progenitoras mais maduras (Figura 2). Neste estudo também foi demonstrada que a clonogenicidade das células do estroma e epitélio endometriais é fortemente influenciada pela ação de três fatores de crescimento: o fator de crescimento derivado de plaquetas, o fator de crescimento transformante  $\alpha$  e o fator de crescimento epidermal. A proliferação clonogênica das células epiteliais endometriais é dependente da presença de uma camada de fibroblastos, reforçando a importância da interação epitélio-estroma para a dinâmica do endométrio humano (Chan et al., 2004).

Em um estudo posterior, Schwab et al. (2005) demonstraram ainda que clonogenicidade nas células estromais e epiteliais está presente tanto em endométrios funcionais como em tecidos endometriais inativos, sugerindo que as células-tronco endometriais persistem durante todo o tempo de vida do indivíduo assim como ocorre com células-tronco adultas de outros tipos de tecidos.

### **1.3.1. Caracterização de células-tronco endometriais**

Pelo fato de ser um tipo celular raro e por apresentar um caráter fenotípico de distinção difícil, múltiplos ensaios têm sido utilizados para a identificação e caracterização de células-tronco adultas. As pesquisas *in vitro* demonstraram a clonogenicidade celular, o potencial proliferativo e a capacidade de diferenciação. Outros ensaios permitiram a avaliação das características fenotípicas específicas destas células. Os estudos *in vivo* envolvem principalmente os ensaios de reconstituição tecidual e ou marcação de células em divisão (revisado em Sasson e Taylor, 2008).

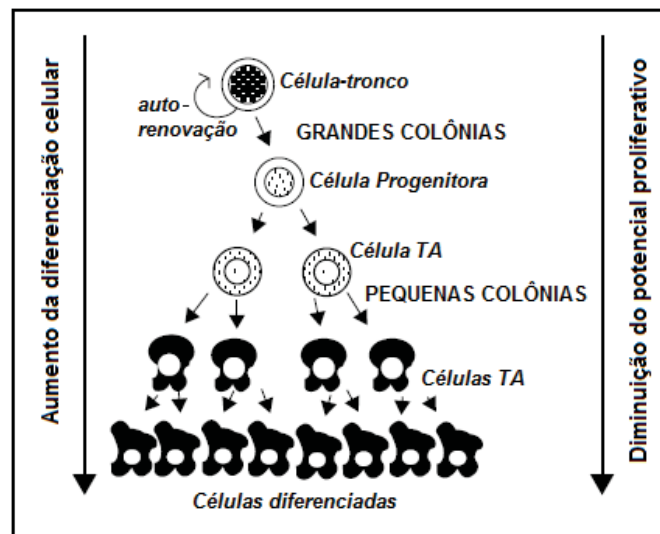


**Figura 2.** Relação entre as células endometriais formadoras de colônias e o modelo hierárquico da diferenciação de células-tronco. As células-tronco apresentam a capacidade de se auto-renovar e se diferenciar em células progenitoras após divisões celulares assimétricas. As células progenitoras também proliferam e se diferenciam nas chamadas *proliferating transit amplifying cells* (TA), as quais, finalmente, transformam-se em células funcionais maduras. Acredita-se, com base em dados experimentais, que as grandes colônias originam-se de células-tronco; enquanto que as pequenas colônias são geradas a partir das células progenitoras (Modificado de Gargett et al., 2007).

Especificamente nas células-tronco endometriais, o padrão de expressão gênica e protéica é pouco conhecido e há um número limitado de marcadores específicos desta linhagem celular. Por esta razão também, há um número bastante reduzido de estudos funcionais que identificaram e caracterizaram as células progenitoras endometriais humanas. Mais recentemente, uma população de células-tronco endometriais foi identificada em preparações celulares de duas frações de filtrado de endométrio humano (Kato et al., 2007). Uma delas compreendia principalmente células epiteliais CD9<sup>+</sup> que após o cultivo (cinco meses) originou um agregado celular com estruturas glandulares e com expressão positiva para E-caderina, sugerindo que o CD9<sup>+</sup> é um possível marcador de células-tronco endometriais.

Outros três estudos também avaliaram a expressão de marcadores específicos das células progenitoras endometriais. A expressão de Oct-4, um fator de transcrição comumente utilizado como marcador de células-tronco embrionárias e adultas (Tai et al., 2005), foi verificada em amostras de endométrio humanas, apresentando maior número de células Oct4<sup>+</sup> nos casos em estágio proliferativo (Matthai et al., 2006). Marcadores de células-tronco adultas também foram identificados no endométrio humano, incluindo BCL-2, c-Kit (CD117) e o CD34 (Cho et al., 2004). Adicionalmente, análises por citometria de fluxo permitiram a identificação de células-tronco fenotipicamente hematopoiéticas (CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) em suspensões de células endometriais humanas que também co-expressavam CD7 e CD56, marcadores específicos de progenitores linfóides (Lynch et al. 2007).

Em camundongos, estudos funcionais *in vivo* consideraram alguns marcadores para identificar populações de células progenitoras endometriais. Em conjunto com os marcadores citados anteriormente, foram utilizados CD31, SCA-1,  $\alpha$ -SMA, CD24, CD44, MAC-1, entre outros (revisado em Gargett et al., 2007).

A determinação de um conjunto de marcadores específicos de células-tronco endometriais humanas pode contribuir para o conhecimento sobre o papel das células progenitoras na EDT.

### **1.3.2. Células-tronco e a origem do endométrio ectópico**

A presença de alterações em células-tronco está associada à patogênese de diferentes doenças proliferativas do endométrio. Em literatura, algumas evidências experimentais indicam o envolvimento das células-tronco endometriais no desenvolvimento da EDT (revisado em Figueira et al., 2011).

Leyendecker et al. (2002) compararam o perfil de expressão do receptor de estrógeno, duas isoformas do receptor de progesterona e a aromatase P450 em amostras de endométrio tópico e lesões endometrióticas de portadoras de EDT e verificaram que o padrão de expressão desses marcadores nos implantes foi semelhante ao observado na camada basal do endométrio tópico. Os autores concluíram que como a população de células-tronco endometriais reside na camada basal do endométrio, é possível que as células progenitoras tenham um papel crucial no surgimento de lesões endometrióides.

Em síntese, são indicativos do envolvimento de células tronco na patogênese da EDT: (1) a origem monoclonal descrita em algumas lesões endometrióticas (Jimbo et al., 1997; Tamura et al., 1998; Tanaka et al., 2003; Wu et al., 2003); (2) a possibilidade de estabelecer culturas primárias prolongadas a partir de clones celulares provenientes de implantes endometrióticos (Tanaka e Umesaki, 2003); (3) a identificação de células progenitoras com elevado potencial de proliferação e diferenciação no fluído menstrual (Meng et al., 2007). Outros achados incluindo a identificação de células-tronco hematopoiéticas e um elevado número de células progenitoras *natural killer* no endométrio de mulheres com infertilidade podem também sugerir a contribuição das células-tronco no desenvolvimento das lesões endometrióides, via sinalização anormal dos processos inflamatórios e angiogênicos (Witz et al., 1994; Sagsveen et al., 2003; Lynch et al., 2007).

Embora existam muitas evidências sobre o papel das células-tronco no desenvolvimento e regeneração do endométrio ectópico, ainda não foram completamente elucidados os mecanismos associados com o desenvolvimento da EDT a partir dessa progênie celular. Baseados em literatura, Maruyama et al. (2010) propuseram um modelo hipotético para a implantação e estabelecimento das lesões endometrióides (Figura 3). Neste modelo, as prováveis células progenitoras endometriais (provenientes da camada

basal ou funcional do endométrio tópico ou ectópico), que são eliminadas juntamente com o endométrio funcional durante o fluxo menstrual, podem também se estabelecer em sítios ectópicos com a ocorrência da menstruação retrógrada, ou permanecer na cavidade uterina e ali estabelecer um endométrio eutópico diferencial. Adicionalmente, este modelo propõe ainda o surgimento de endométrio ectópico a partir de células-tronco derivadas da medula óssea e da parede do endotélio vascular.

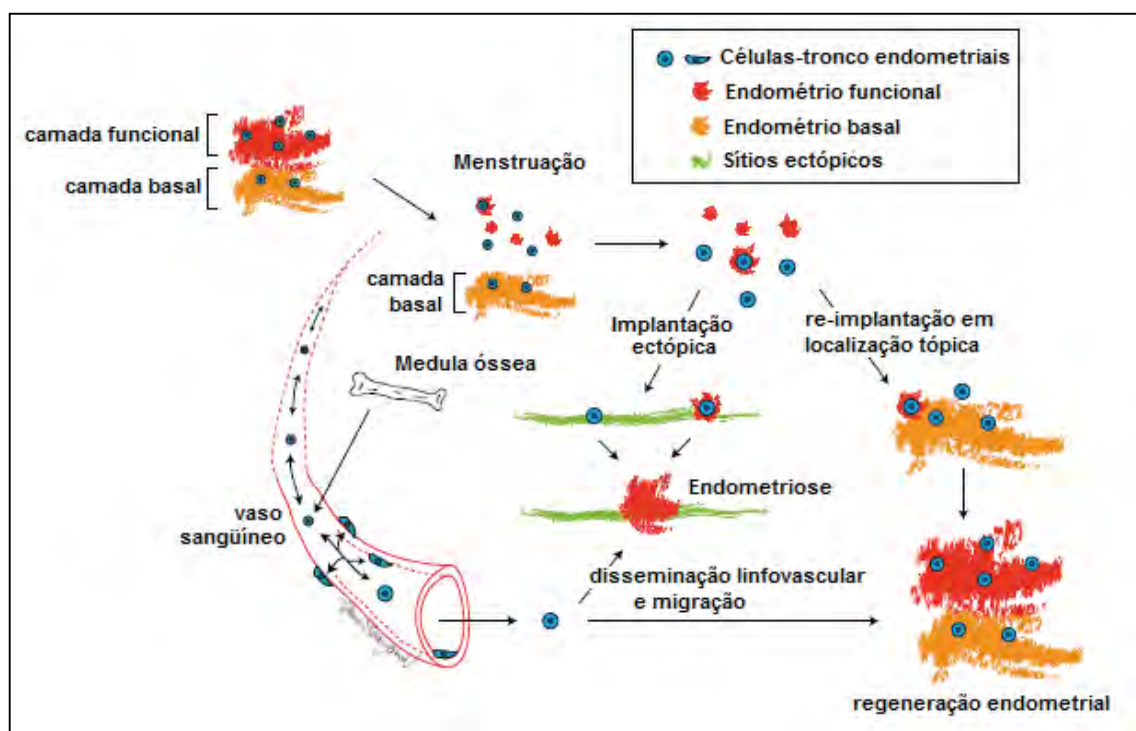


**Figura 3.** Modelo proposto para a implantação tópica e ectópica das células-tronco endometriais e subsequente desenvolvimento das lesões endometrióticas (modificado de Maruyama et al., 2010).

Assim sendo, tanto no endométrio tópico como no ectópico, as células progenitoras endometriais podem originar os tecidos e vasos endometriais na cavidade uterina, como também nas lesões endometrióticas. Essa hipótese associa o envolvimento das células progenitoras endometriais na regeneração do endométrio e na origem e manutenção dos implantes endometrióticas (revisado em Maruyama et al., 2010).

#### 1.4. Endometriose e Tumores associados

Embora seja considerada uma doença benigna, a EDT possui de fato algumas características tipicamente neoplásicas como crescimento monoclonal, proliferação clonal (Jimbo et al., 1997; Tamura et al., 1998; Wu et al., 2003) e a propensão à metástase e invasão tecidual (Swiersz, 2002).

Semelhante a diversos tipos de tumores, a EDT apresenta uma capacidade de invasão do estroma adjacente, a associação com lesões à distância como também a presença de alterações genéticas (Thomas e Campbell, 2000; Somigliana et al., 2006; Silveira et al., 2009). Além disso, as teorias etiopatogênicas da EDT envolvem fatores de crescimento e citocinas associados à regulação da proliferação celular e à angiogênese que ocorrem durante o processo carcinogênico. Podgaec et al. (2007) relataram que a EDT, enquanto doença inflamatória, apresenta alterações no componente Th2, demonstradas pelo aumento relativo dos níveis de citocinas, as quais são representativas desse padrão de resposta imunológica. Outros estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que as respostas imunológicas desencadeadas pela EDT assemelham-se àquelas apresentadas pelas células tumorais que evadiram da imunovigilância (Braun e Dnowski, 1998).

De acordo com as evidências relatadas em literatura, acredita-se que a transformação maligna da EDT pode envolver basicamente três principais mecanismos carcinogênicos. No primeiro, o epitélio das lesões endometrióticas atuaria como precursor tumoral contribuindo para a ocorrência de tumores, malignos ou pré-malignos, epiteliais e/ou epitélio-estromais de diferentes tipos histológicos. O segundo mecanismo assemelha-se ao processo carcinogênico que ocorre no endométrio sob a influência do estrogênio, e está associado ao desenvolvimento de carcinoma endometriótide via hiperplasia endometrial. O terceiro evento é fortemente influenciado por um microambiente anormal caracterizado por exposição persistente a estresse oxidativo e

inflamação, determinando o surgimento de fenótipos característicos de carcinoma de células claras (revisado em Mandai et al., 2009).

Sampson (1925) foi o primeiro a relatar que a EDT poderia favorecer a promoção de neoplasias. Posteriormente, a doença foi associada clinicamente com subtipos de neoplasias, principalmente com o carcinoma de endométrio e o de células claras de ovário (Swiersz, 2002).

Estima-se que 1% dos casos de EDT esteja relacionado com câncer (La Grenade e Silverberg, 1988). Aproximadamente 78% dos casos de câncer associados com EDT ocorrem nos ovários, e há coexistência de lesões endometrióides ovarianas e carcinoma de ovário em 4,2% a 24% dos casos (Fukunaga et al., 1997; Jimbo et al., 1997). Os outros 22% estão relacionados com EDT extra-ovariana, e os tumores geralmente se encontram no septo reto-vaginal, cólon, bexiga, vagina e peritônio da região pélvica (Brinton et al., 1997; Abrão et al., 2000).

Diversos tipos de carcinoma e sarcoma foram correlacionados com focos de endométrio ectópico (revisado em Benoit et al., 2006; Baldi et al., 2008). Há uma elevada frequência de casos de tumores intestinais associados à EDT (Slavin et al., 2000; Jones et al., 2002), e estes incluem principalmente adenocarcinomas primários localizados no cólon retossigmóide. Embora menos frequentes que os carcinomas de endométrio e neoplasias de células claras, os tumores endocervicais mucinosos também foram associados com EDT pélvica em aproximadamente 30% dos casos (Rutgers e Scully, 1988).

Especificamente no câncer de ovário, a EDT é considerada um fator de risco importante e dados epidemiológicos apontam que a incidência desta doença em mulheres com câncer de ovário é de 8 a 30% (Fukunaga et al., 1997; Ogawa et al., 2000; Oral et al., 2003). Outros estudos demonstraram que 15%-40% dos casos carcinomas ovarianos endometrióides também apresentavam lesões EDT (Erzen et al., 2001; Stern

et al., 2001; Clement et al., 2002; Modesitt et al., 2002). Esta associação pode estar relacionada à presença de fatores patogênicos comuns envolvidos no desenvolvimento de ambas as afecções ginecológicas incluindo a predisposição familiar, alterações genéticas, além de fatores imunobiológicos, angiogênicos, hormonais e de adesão celular. Além disso, perdas de heterozigose (LOH) de diferentes regiões genômicas foram observadas em comum nas amostras de tumores ovarianos e nas lesões endometrióides (revisado em Kobayashi et al., 2009), confirmando essa associação.

A elevada frequência de associações EDT-tumor também tem influenciado as análises genômicas globais na busca de marcadores genéticos. Banz et al. (2009) avaliaram o perfil de expressão gênica de EDT associada ao carcinoma ovariano endometrióide de sete pacientes e EDT associada ao câncer ovariano de cinco mulheres. Após esta análise, foram identificadas duas assinaturas de expressão gênica. O primeiro grupo era caracterizado por alterações exclusivas nos genes *SICA2*, *CCL14* e *TDGF1*, as quais estavam presentes exclusivamente nas amostras de EDT e carcinoma endometrióide ovariano, e ausentes no câncer de ovário e tecidos ovarianos normais; estes genes estão associados com o sistema auto-imune e com a regulação da resposta inflamatória. O segundo grupo, por sua vez, apresentou expressão anormal em genes envolvidos na interação célula-célula, proliferação e diferenciação celular (*STAR*, *SPINT1*, *KRT8*, *FoxM1B*, *FOXMB1*, *CRABP1* e *CLDN7*) e foram associados exclusivamente aos tumores malignos. Esses dados indicaram um conjunto de genes como potenciais marcadores que permitem a distinção entre tecidos ovarianos malignos e benignos e são capazes de predizer o desenvolvimento de carcinoma ovariano em mulheres com EDT.

Embora alguns dados em literatura sugiram o aumento de risco de desenvolver câncer em mulheres com EDT, as evidências biológicas que confirmam a presença da doença com condição pré-neoplásica são insuficientes e inconsistentes. Assim, apesar das lesões endometrióticas exibirem características malignas tais como proliferação,

vascularização e invasão tecidual, alguns aspectos tumorais, como alterações genéticas, ainda permanecem indefinidos (Viganò et al., 2006).

### **1.5. Genética da Endometriose**

A EDT é considerada uma doença complexa causada pela interação de fatores genéticos e ambientais (Montgomery et al., 2008; Hansen e Eyster, 2010). Além dos fatores de risco conhecidos, a contribuição de diferentes componentes genéticos na predisposição e suscetibilidade de desenvolver EDT tem sido amplamente suportada por inúmeros estudos.

Anormalidades genéticas envolvidas na gênese e na progressão de tumores ginecológicos vêm sendo investigadas e identificadas na EDT, sugerindo que o desenvolvimento da doença pode ser resultado de alterações da expressão de proto-oncogenes e genes supressores de tumor envolvidos na regulação de diferentes processos celulares (Hitti et al., 1990; Lee et al., 1992; Jimbo et al., 1997; Mommers et al., 1998; Nezhat et al., 2002).

#### **1.5.1. História Familiar**

Estudos familiares têm revelado um risco aumentado de até 6% de desenvolver EDT em indivíduos com história familiar positiva para a doença (Kennedy et al., 1998; Zondervan et al., 2002; Bischoff e Simpson, 2000; Stefansson et al., 2002; Treolar et al., 2002; Viganò et al., 2003; Painter et al., 2011).

Em 1980, Simpson et al. relataram que nove de 123 (5.9%) mulheres com EDT apresentavam pelo menos uma irmã com a doença e 10 das 123 tinham a mãe acometida. No mesmo ano, outro estudo demonstrou que mulheres com irmã ou mãe

afetada apresentavam uma maior probabilidade de desenvolver EDT severa (Malinak et al., 1980).

Apesar dos fortes indícios sobre a influência genética no risco de desenvolver EDT, é ainda limitado o número de estudos que buscam variantes genéticas associadas à predisposição a esta doença. Baseando-se em estudos de ligação, inúmeras regiões genômicas foram investigadas entre parentes de primeiro grau, portadores ou não de EDT, provenientes de diferentes populações (incluindo grupos australianos e britânicos) (Kennedy et al., 2001; Stefansson et al., 2002; Treolar et al., 2005). Estes estudos relataram locos cromossômicos específicos que podem abrigar genes candidatos envolvidos na suscetibilidade a doença, incluindo genes supressores tumorais (*PTEN* e *TP53*), receptores de estrógeno, progesterona e andrógeno, entre outros (Giudice e Kao, 2004). Outras análises de *linkage* também identificaram locos de alta penetrância mapeados no cromossomo 7 (7p13-p15; 7p22.1 e 7q36.3) que foram associados à etiologia da EDT familiar (Treolar et al., 2005; Zondervan et al., 2007). Recentemente, Painter et al. (2011) também identificaram um loco no cromossomo 7, precisamente em 7p15.2, associado ao desenvolvimento da EDT após análise genômica em larga escala.

### **1.5.2. Alterações genômicas na endometriose**

A instabilidade genômica é uma característica marcante das células tumorais. O endométrio ectópico também apresenta anormalidades genéticas somáticas semelhantes às aquelas reportadas em vários tipos de neoplasias, que determinam a expansão clonal de células geneticamente anormais (revisado em Silveira et al., 2009).

Na EDT, os estudos de alelotipagem permitiram a identificação de deleções em regiões genômicas críticas (incluindo segmentos dos cromossomos 5q, 6q, 9p, 11q e 22q) e demonstraram uma associação potencial com carcinomas ovarianos. Um dado interessante é que algumas dessas regiões abrigam ou encontram-se próximas a genes

supressores de tumor envolvidos no ciclo celular (Prowse et al., 2005; revisado em Tempfer et al., 2009).

Análises moleculares utilizando marcadores de microsatélites em amostras de EDT de diferentes estadios revelaram LOH em regiões dos cromossomos 1, 9 e 17. Estas alterações foram associadas à inativação dos genes *APOA2* (*apolipoprotein A-II*), *TP16* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), *GALT* (*galactose-1-phosphate uridylyltransferase*) e *TP53* (*tumor protein p53*), respectivamente. Deleções nessas regiões cromossômicas são freqüentemente descritas em carcinomas ovarianos. Especificamente, em 9p21, onde o gene *TP16* está mapeado, há outros genes candidatos que podem ser potenciais marcadores diagnósticos e/ou prognósticos na EDT (revisado em Baldi et al., 2008).

Baseando-se nas técnicas de hibridação *in situ*, outras potenciais regiões genômicas e diferentes genes candidatos foram associados ao desenvolvimento da EDT. Análises de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) em amostras de EDT relataram elevada freqüência de monossomia nos cromossomos 16 e 17, além de trissomia 11 (Viganò et al., 2006).

Körner et al. (2006) investigaram alterações numéricas nos cromossomos 1, 7, 9 e 17 em diferentes grupos de EDT: pacientes com EDT extragonadal, EDT ovariana sem desenvolvimento tumoral, EDT com transição direta a adenocarcinoma de endométrio e endométrio normal. As trissomias dos cromossomos 1 e 7 e as monossomias do 9 e 17, características nos adenocarcinomas de endométrio ovariano, também foram detectadas em baixa freqüência nas amostras de EDT. Esses achados parecem sugerir que a EDT pode ser uma precursora do adenocarcinoma ovariano e que a instabilidade cromossômica em pacientes EDT pode favorecer a transformação neoplásica. A alta freqüência de alterações cromossômicas encontrada nos casos de EDT ovariana comparada com os de EDT extragonadal, sugere uma participação importante do

estroma ovariano na indução de alterações genéticas, que pode eventualmente levar ao desenvolvimento de um carcinoma.

Uma variedade de alterações genético-moleculares foi descrita e relacionada à via do estrógeno. A expressão aumentada do receptor de estrógeno alfa (*ESR1*) foi relatada por Matsuzaki et al. (2001) em casos de EDT ovariana e peritoneal. Além disso, como descritos anteriormente, diferentes polimorfismos genéticos em genes codificadores de receptores de estrógeno e progesterona também foram associados com o desenvolvimento da EDT (Kitawaki et al., 2001; Wieser et al., 2002).

A expressão anormal de fatores de crescimento, como o *TGFA* (*transforming growth factor-alpha*) e *IGF-I* (*insulin-like growth factor-I*) foram relacionados ao desenvolvimento da EDT (Lebovic et al., 2001; Druckmann e Rohr, 2002). A expressão aumentada do gene *WNT7A* foi detectada nas células endometriais do epitélio e estroma microdissecadas de lesões endometrióides. O gene *WNT7A* codifica uma glicoproteína que desempenha um papel importante na embriogênese, proliferação e diferenciação celular e na comunicação epitélio-mesênquima. Em camundongos, a atividade do *WNT7A* é essencial para o desenvolvimento do útero na formação do endométrio glandular. Dessa forma, a expressão anormal do *WNT7A* em lesões endometrióides sugere a participação desse gene na patofisiologia da EDT (Gaetje et al., 2007).

Alterações moleculares que afetam outras vias de sinalização celular também são consideradas eventos importantes para a implantação e sobrevivência do endométrio ectópico no peritônio, já que modificam a homeostasia fisiológica local gerando um microambiente distinto. Os principais moduladores biológicos que mantêm a homeostasia neste microambiente incluem principalmente os fatores de crescimento, citocinas e mediadores inflamatórios (revisado em Silveira et al., 2009).

A inflamação é considerada um processo importante no desenvolvimento da EDT, com implicações local e sistêmica. As reações inflamatórias locais que ocorrem no sítio

da lesão endometrióide estimulam a secreção de diferentes proteínas pró-inflamatórias. Desse modo, a expressão anormal das *interleucinas 1, 6 e 8* e *TNF- $\alpha$*  (*fator de necrose tumoral  $\alpha$* ) pode alterar diversos processos fisiológicos e permitir a sobrevivência das células endometrióides em localizações extra-uterinas (revisado em Nezhat et al., 2008).

Atualmente, métodos que permitem triagens de todo o genoma em alta resolução é uma realidade na pesquisa científica e têm resultado na caracterização do perfil genômico, transcricional e proteômico de diferentes tipos de doenças genéticas, incluindo a EDT (Siristatidis, 2009).

A metodologia de hibridação genômica comparativa (*Comparative Genomic Hybridization* - CGH) é uma ferramenta da citogenética molecular que possibilita uma análise ampla e abrangente dos ganhos e perdas presentes no genoma. A CGH independe da avaliação de células metafásicas do tecido alvo e requer a obtenção de DNA das células de interesse, sendo, desta forma, uma abordagem bastante vantajosa na investigação de desequilíbrios genômicos, principalmente nos tecidos em que a obtenção de preparações celulares é bastante complexa (Kallioniemi et al., 1992).

Os avanços recentes nesta técnica possibilitaram a detecção de aneussomias de pequenas regiões cromossômicas. Este procedimento, conhecido como CGH de Alta Resolução (*High Resolution CGH* - HR-CGH), permitiu o aumento da sensibilidade e especificidade na detecção de alterações genômicas. Utilizando intervalos de referência padronizados com amostras normais em detrimento de intervalos fixados, a HR-CGH possibilita a identificação de deleções no alcance de 3–5 Mb, dependendo da região cromossômica envolvida e do grau de condensação dos cromossomos (Kirchhoff et al., 2001; Schoumans et al., 2004).

Na EDT, os escassos estudos utilizando CGH convencional permitiram a identificação de ganhos e perdas genômicas, incluindo principalmente perdas nos cromossomos 1p e 22q, em 5p, 6q, 7p, 9q, cromossomo 16 e 17q, e ganhos em 1q, 6q,

7q e 17q. Análises de FISH confirmaram que ganhos em 17q estavam associados à amplificação do oncogene *HER-2/ERBB2* (revisado em Nezhat et al., 2008).

Novas tecnologias baseadas em citogenética molecular têm possibilitado a identificação de alterações genômicas no número de cópias de DNA. A CGH baseada em *microarrays* (CGH *arrays*, CGH *microarrays*, CGH matriz ou aCGH) foi descrita primeiramente em 1997 (Solinas-Toldo et al., 1997) e permite a triagem genômica em alta resolução. Este procedimento tem implicações importantes para a análise de genomas pelo fato de possibilitar a descoberta de biomarcadores preditivos e a identificação de genes envolvidos no desenvolvimento e progressão de doenças genéticas. A aCGH permite a detecção quantitativa em alta resolução das alterações no número de cópias de regiões genômicas específicas em diversos tipos de doenças, e associações com características clínicas (Tan et al., 2007).

Na aCGH, o princípio metodológico é semelhante ao da CGH cromossômico, superando, entretanto, as limitações de resolução pelo uso de clones ou seqüências imobilizados em uma lâmina de vidro em posições bem definidas. Particularmente, os *arrays* de oligonucleotídeos (ou oaCGH) compreendem fragmentos de DNA de fita simples ou cDNA, com tamanho variando de 25 a 85 nucleotídeos, representativos das seqüências das regiões codificadoras e/ou não-codificadoras dos genes de interesse. Microarranjos de oligoarrays têm sido utilizados para a identificação e caracterização de mutações, pequenas e grandes deleções e duplicações (incluindo aneuploidias e amplificações gênicas), determinação de perfis de expressão gênica, como também para triagem de variações polimórficas no número de cópias de DNA genômico (Gunn et al., 2007).

As variações no número de cópias ou CNVs (*Copy Number Variations*) são regiões polimórficas extremamente comuns no genoma humano e parecem ser resultantes da instabilidade gerada por características arquitetônicas denominadas

duplicações segmentais que envolvem fragmentos de DNA de um kilobase (Kb) a várias megabases (Redon et al., 2006; Beckmann et al., 2007). Recentemente, estudos genômicos em grandes populações de indivíduos saudáveis têm revelado a presença de mais de 27 mil alterações estruturais no genoma humano, incluindo principalmente deleções (~22.000) como também inserções e duplicações (ambas abrangendo ~6.000 alterações) (Mills et al., 2011).

As CNVs estão preferencialmente localizadas próximas às regiões conhecidas como duplicons, que representam extensas regiões com seqüências homólogas e que estão associadas a regiões de ampliações gênicas em tumores. Acredita-se que as CNVs originam-se de rearranjos recorrentes por recombinação de seqüências homólogas e não-homólogas, erros de replicação do DNA ou ainda induzida por danos físico-químicos resultando em duplicações, inversões ou deleções de seqüências intermediárias (Braude et al., 2006; Hastings et al., 2009). Dessa maneira, quando essas variações estruturais do genoma alteram as dosagens gênicas e/ou interferem na estrutura e na regulação da expressão de genes supressores de tumor, oncogenes e outras seqüências reguladoras não-codificadoras (p. ex., microRNAs), podem ser relevantes na predisposição a doenças e influenciar a resposta a terapias (Estivill e Armengol, 2007; Bandiera et al., 2010).

As CNVs podem ser detectadas pela metodologia de aCGH em amostras de portadores de doenças, assim como em células de indivíduos fenotipicamente normais. Embora a maioria das CNVs sejam relativamente pequenas (~100Kb) e herdadas dos progenitores, algumas delas podem ser extremamente grandes e não-herdáveis, podendo estar associadas à alteração no nível de expressão de genes conhecidos (CNVs funcionais) (revisado em Lee et al., 2007).

Apesar do impacto fenotípico, acredita-se que essas variações podem atuar em interação com o ambiente (por exemplo, receptores olfativos) e influenciar a

suscetibilidade a doenças complexas. Atualmente, estima-se que as CNVs estão presentes em mais de 21.000 seqüências gênicas, podendo afetar a estrutura e a atividade de genes envolvidos em processos biológicos críticos relacionados com regulação do ciclo celular, resposta imune e interações com o meio ambiente (revisado em de Smith et al., 2008; Shlien e Malkin, 2010). Por esta razão, as CNVs podem ser potenciais marcadores prognósticos e preditivos, ou ainda fatores de risco importantes no desenvolvimento de tipos específicos de tumores e outras doenças genéticas (revisado em de Smith et al., 2008; Savas et al., 2010).

Para o nosso conhecimento, há poucos estudos de aCGH em EDT. O primeiro estudo (Guo et al., 2004) utilizou esta estratégia para avaliar alterações genômicas em amostras de EDT de cinco pacientes submetidas à laparoscopia ou laparotomia que se apresentavam em diferentes estágios da doença (I a IV). O grupo controle foi composto por amostras de endométrio de quatro mulheres normais, após abortamento, e uma amostra adicional de placenta normal. As amostras em blocos de parafina foram microdissecadas a laser e somente as células epiteliais foram submetidas à extração do DNA. O DNA genômico marcado foi hibridado em plataformas composta por 995 clones de BACs representativos de todo o genoma. As regiões envolvidas em perdas e ganhos localizavam-se principalmente nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 8, 11 e 13. Alguns resultados foram concordantes com os encontrados por Gogusev et al. (1999) que utilizaram CGH convencional em amostras de EDT de diferentes sítios (ovariana, peritoneal e nódulos umbilicais); entretanto, nenhuma alteração foi encontrada no cromossomo 7 pela aCGH. As regiões mais freqüentemente associadas com ganhos genômicos foram 3p14, 10q26 e 13q33. Perdas em 1p36.21–36.33 também foram observadas; nesta região estão mapeados alguns genes supressores de tumor importantes, incluindo os genes codificadores de receptores do fator de necrose tumoral (*TNFRSF1B*, *TNFRSF12*, *TNFRSF12L*, *TNFRSF14* e *TNFRSF18*) que participam dos processos de apoptose e de ativação celular (Pimentel-Muinos e Seed, 1999). Todas essas alterações foram

confirmadas pela análise quantitativa da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-qPCR) em amostras de lesões endometrióides e sangue periférico de duas pacientes com EDT. Algumas regiões envolvidas em deleções pela aCGH (A002H48 - 1p36.21–36.33; D19S408 - 19q13.31; RH68130 - 4p16.1–16.3; D9S1198 - 9q34.13–34.3) apresentaram perda de seqüência pela análise de LOH. Análises de LOH também confirmaram as deleções por CGH nas regiões 6p22.3–24 e 1p34.3–36.11. Os autores concluíram que a grande variabilidade de alterações encontradas entre os casos avaliados é resultado da heterogeneidade entre as pacientes e possivelmente pela existência de múltiplas vias na patogênese da EDT (Guo et al., 2004).

Recentemente, Zafrakas et al. (2008) utilizaram a aCGH para avaliar alterações no número de cópias de DNA genômico e o perfil de expressão gênica em amostras de EDT ovariana de estadios III e IV (dez amostras). A investigação de perdas e ganhos pela aCGH foi realizada utilizando uma plataforma contendo 5.659 clones (BACs) em triplicatas, com resolução de aproximadamente 1,0 Mb, representativas de todo genoma. Para a análise de expressão gênica foi utilizada uma plataforma de oligonucleotídeos de alta densidade, composta por mais de 40.000 seqüências gênicas e ESTs (*expressed sequence tags*). Embora o método de *oligoarrays* tenha detectado alteração no perfil de expressão de genes específicos (principalmente genes envolvidos na regulação do ciclo celular, processos relacionados a metabolismo celular e homeostasia), a análise da aCGH revelou a ausência de deleções e amplificações significativas. Segundo os autores, a detecção do padrão genômico normal pela aCGH pode estar relacionado à heterogeneidade da EDT presente entre as amostras avaliadas. Uma explicação alternativa é a presença de células normais no material analisado, já que as amostras não foram microdissecadas.

Alguns estudos em literatura têm utilizado análise de expressão gênica em larga escala para caracterizar o perfil de expressão gênica presente no endométrio típico e ectópico, e assim identificar biomarcadores da doença.

Neste contexto, as análises de *microarray* de expressão têm revelado perfis distintos e diferenças moleculares significativas entre o endométrio típico de portadoras e não portadoras da doença. Nesses estudos, as alterações de expressão foram detectadas principalmente em genes relacionados com adesão celular, homeostasia e remodelamento da matriz extracelular (Eyster et al., 2007; Sha et al., 2007), apoptose, angiogênese, metabolismo do estrógeno (especialmente, a aromatase), receptores de progesterona (Kao et al., 2003), e aqueles envolvidos na via de sinalização *RAS/RAF/MAPK* (Matsuzaki et al., 2004; 2005; 2006). De maneira semelhante, estudos recentes utilizando modelos animais demonstraram o aumento de expressão de genes associados com adesão celular, ligação de integrinas, matriz extracelular, atividade de metaloenzimas, catabolismo de colágeno, processos angiogênicos e imunoinflamatórios (Flores et al., 2007; Konno et al., 2007; Pelch et al., 2009; Umezawa et al., 2009).

**Objetivos**



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Gerais:**

- Avaliar ganhos e perdas genômicas por HR-CGH nos componentes epitelial e estromal de cada lesão em grupos definidos de amostras de EDT de diferentes sítios anatômicos (extragonadal e ovariana, peritoneal, intestinal e do trato urinário) de uma mesma paciente, assim como o endométrio tópico.
- Avaliar o padrão de alterações genômicas em casos de EDT intestinal profunda por aCGH para identificar sequências específicas e as vias biológicas alteradas.

### **2.2. Específicos:**

- Identificar marcadores putativos presentes nas sequências genômicas envolvidas em perdas e ganhos consensos;
- Comparar os achados entre os diferentes sítios anatômicos, com características clínicas e dados histopatológicos.

## Material e Métodos



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Caracterização das amostras

As pacientes incluídas neste estudo foram provenientes do Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, SP, onde foram submetidas a tratamento cirúrgico e seguimento clínico sob a supervisão do Prof. Dr. Maurício Simões Abrão. Este projeto foi encaminhado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da do Hospital Sírio-Libanês, SP (Registro CEP: HSL2007/24) e todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

As amostras obtidas foram divididas em dois grupos distintos. O **Grupo I** compreende um total de 20 amostras de EDT de diferentes sítios anatômicos e três amostras de endométrio tópico, todas fixadas em formalina e em blocos de parafina (FFEP), provenientes de oito pacientes, cuja idade variou de 26 a 43 anos. Estas amostras foram submetidas à análise de alterações genômicas pela metodologia da HR-CGH e de expressão proteica por análise de imuno-histoquímica em um conjunto de sete marcadores de células-tronco.

O segundo grupo (**Grupo II**) é composto exclusivamente por 18 amostras congeladas de EDT infiltrativa/profunda intestinal provenientes de 18 pacientes distintas, com idade variando entre 23 e 58 anos. Nessas amostras, foi realizada a triagem genômica de CNVs utilizando a metodologia da aCGH.

Todas as pacientes foram avaliadas pela história clínica, exames físicos e complementares (dosagem de CA125, ultra-sonografia pélvica e ou transvaginal e ressonância nuclear magnética, quando apropriado), conforme indicação clínica, para confirmação da hipótese diagnóstica. Após laparoscopia, a presença de lesões EDT foi confirmada histologicamente em todos os casos. As pacientes com EDT tiveram sua

doença classificada durante o procedimento cirúrgico pelos critérios da *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM), revisado em 1996, em estádios de I a IV.

As informações clínicas relevantes das pacientes (**Grupos I e II**) e as características histopatológicas das lesões selecionadas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Informações clínicas das pacientes e caracterização histopatológicas das lesões endometrióides dos Grupos I e II avaliadas neste estudo.

| Casos     | Idade | Sintomas clínicos                                                                                   | Sítios de EDT         | Identificação da amostra | Características Anatomopatológicas                                                                                                                                                                   | Profundidade anatomopatológica da lesão                                                  | Outros sítios de EDT e achados cirúrgicos                           | Estadiamento |
|-----------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------|
| Grupo I   |       |                                                                                                     |                       |                          |                                                                                                                                                                                                      |                                                                                          |                                                                     |              |
| FC01-0189 | 39a   | Dismenorréia moderada, dor pélvica acíclica severa, alteração intestinal (constipação), dispaurenia | Parede de Sigmóide    | FC01-0189 S              | Padrões estromal e glandular misto de diferenciação (tipos endometrióide, epitélio glandular indiferente e seroso) associados a cicatriz e sinais de hemorragia                                      | EDT profunda, com envolvimento de camadas serosa, musculares e mucosa da parede sigmóide | EDT em septo reto-vaginal; adenomioma uterino e leiomiomas uterinos | 4            |
|           |       |                                                                                                     | Ovário                | FC01-0189 O              | Padrões estromal e glandular misto de diferenciação (tipos endometrióide e indiferente                                                                                                               | EDT Superficial                                                                          |                                                                     |              |
| FC03-0248 | 33a   | Dismenorréia severa, dor pélvica moderada, alteração intestinal, esterilidade primária, dispaurenia | Parede retossigmóide  | FC03-0248 RS             | Padrões estromal e glandular misto de diferenciação, com alguns focos acompanhados de fibrose de padrão cicatricial, macrófagos contendo pigmento de hemossiderina e infiltrado inflamatório crônico | EDT profunda, com envolvimento da camada muscular interna                                | -                                                                   | 4            |
|           |       |                                                                                                     | Região retro-cervical | FC03-0248 RC             | Padrões estromal e glandular bem diferenciado, com fibrose associada a tecido endometrial                                                                                                            | EDT Superficial                                                                          |                                                                     |              |
|           |       |                                                                                                     | Parede retal          | FC03-0248 R              | Padrões estromal e glandular bem diferenciado, com fibrose associada a tecido endometrial                                                                                                            | EDT Superficial                                                                          |                                                                     |              |

Tabela 1. Continuação.

| Casos     | Idade | Sintomas clínicos                                                                                                  | Sítios de EDT           | Identificação da amostra | Características Anatomopatológicas                                                                                                                                              | Profundidade anatomopatológica da lesão                                   | Outros sítios de EDT e achados cirúrgicos    | Estadiamento |
|-----------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------|
| Grupo I   |       |                                                                                                                    |                         |                          |                                                                                                                                                                                 |                                                                           |                                              |              |
| FC03-0519 | 43a   | Dismenorréia severa, dor pélvica acíclica severa, alteração intestinal, dispaurenia, esterilidade primária         | Sigmóide                | FC03-0519 S              | Padrões estromal e glandular misto de diferenciação, de localização transmural (predomínio de lesões com epitélio indiferente ou seroso) em segmento medindo 3,5 cm de extensão | EDT Profunda, com envolvimento de submucosa até tecido adiposo pericólico | EDT em peritônio                             | 4            |
|           |       |                                                                                                                    | Ovário                  | FC03-0519 O              | Padrão estromal, forma cística                                                                                                                                                  | EDT Superficial                                                           |                                              |              |
| FC03-1465 | 28a   | Dismenorréia incapacitante, dor pélvica aíclica moderada, alteração intestinal, esterilidade primária, dispaurenia | Peritônio               | FC031465 P               | Padrões estromal e glandular misto de diferenciação (lesão branca); epitélio glandular endometrióide e indiferente                                                              | EDT Superficial                                                           | EDT em sigmóide, obstrução tubárea bilateral | 4            |
| FC03-1965 | 26a   | Dismenorréia incapacitante, dor pélvica acíclica severa, esterilidade primária, dispaurenia                        | Parede vesical (bexiga) | FC03-1965 V              | Padrão estromal                                                                                                                                                                 | EDT Profunda, envolvendo tecido adiposo                                   | EDT em ovário, peritônio e parede retal      | 4            |
|           |       |                                                                                                                    | Parede sigmóide         | FC03-1965 S              | Padrões estromal e glandular misto de diferenciação (endometrióide e seroso)                                                                                                    | EDT Profunda, com envolvimento da musculatura                             |                                              |              |

Tabela1. Continuação.

| Casos     | Idade | Sintomas clínicos                                                                                                                         | Sítios de EDT                                      | Identificação da amostra   | Características Anatomopatológicas                                                          | Profundidade anatomopatológica da lesão                                                               | Outros sítios de EDT e achados cirúrgicos                                                                                   | Estadiamento |
|-----------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Grupo I   |       |                                                                                                                                           |                                                    |                            |                                                                                             |                                                                                                       |                                                                                                                             |              |
| FC04-1080 | 40a   | Dismenorréia incapacitante, dor pélvica acíclica moderada, alterações intestinais (dor e sangramento), esterilidade primária, dispaurenia | Ovário                                             | FC04-1080 O                | Padrões estromal e glandular misto de diferenciação (endometrióide e seroso), forma cística | EDT superficial                                                                                       | EDT em bexiga e região peritonal (retro-uretral); pólipos endometrial simples com atividade proliferativa e secretora focal | 4            |
|           |       |                                                                                                                                           | Retossigmóide (leões I, II e III)                  | FC04-1080 RS               | Padrões estromal e glandular misto de diferenciação (endometrióide, seroso e indiferente)   | EDT Profunda: lesão estendendo-se até submucosa e outra lesão infiltrando até camada muscular interna |                                                                                                                             |              |
|           |       |                                                                                                                                           | Região inter-sacro esquerda e para-tubária direita | FC04-1080 I e FC04-1080 PT | Padrões estromal e glandular misto de diferenciação (endometrióide, indiferente e seroso)   | EDT Superficial                                                                                       |                                                                                                                             |              |

Tabela 1. Continuação.

| Casos     | Idade | Sintomas clínicos                                                                                        | Sítios de EDT              | Identificação da amostra | Características Anatomopatológicas                                                        | Profundidade anatomopatológica da lesão                                       | Outros sítios de EDT e achados cirúrgicos                                   | Estadiamento |
|-----------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------|
| FC04-1132 | 31a   | Dismenorréia incapacitante, dor pélvica acíclica leve, dor intestinal, esterilidade primária, dipaurenia | Retossigmóide              | FC04-1132 RS             | Padrões estromal e glandular misto de diferenciação                                       | EDT Profunda: envolvimento de gordura pericólica até mucosa)                  | EDT em ovário (direito e esquerdo, tuba uterina esquerda e bexiga; teratoma | 4            |
|           |       |                                                                                                          | Ligamento redondo esquerdo | FC04-1132 L              | Padrões estromal e glandular bem diferenciado                                             | EDT Superficial                                                               |                                                                             |              |
|           |       |                                                                                                          | Retro-cervical             | FC04-1132 RC             | Padrões estromal e glandular bem diferenciado                                             | EDT Superficial                                                               |                                                                             |              |
| FC04-1181 | 33a   | Dismenorréia moderada, dor pélvica acíclica leve, sangramento intestinal, dispaurenia                    | Sigmóide                   | FC04-1181 S              | Padrões estromal e glandular misto de diferenciação (endometrióide, indiferente e seroso) | EDT Profunda, com envolvimento de todos os estratos da parede serosa à mucosa | Adenomioma uterino e adenomiose                                             | 4            |
| Grupo II  |       |                                                                                                          |                            |                          |                                                                                           |                                                                               |                                                                             |              |
| 18        | 23a   | Dimenorréia severa                                                                                       | Retossigmóide              | 18                       | Padrão estromal                                                                           | EDT profunda                                                                  | EDT em ovário                                                               | 4            |
| 83        | 32a   | Dismenorréia severa, esterilidade, alterações intestinais e dispareunia                                  | Retossigmóide              | 83                       | Padrão estromal indiferente                                                               | EDT profunda, com envolvimento de serosa                                      | EDT peritoneal                                                              | 2            |

Tabela1. Continuação.

| Casos    | Idade | Sintomas clínicos                                                                                         | Sítios de EDT | Identificação da amostra | Características Anatomopatológicas     | Profundidade anatomopatológica da lesão                       | Outros sítios de EDT e achados cirúrgicos                                                | Estadiamento |
|----------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Grupo II |       |                                                                                                           |               |                          |                                        |                                                               |                                                                                          |              |
| 89       | 32a   | Dismenorréia severa, dor pélvica acíclica, esterilidade, alterações intestinais e dispareunia             | Retossigmóide | 89                       | Padrão estromal bem diferenciado       | EDT profunda, com envolvimento da camada muscular externa     | EDT peritoneal                                                                           | 4            |
| 116      | 35a   | Alterações intestinais                                                                                    | Retossigmóide | 116                      | Padrão estromal misto de diferenciação | EDT profunda, com envolvimento da camada muscular interna     | EDT ovariana                                                                             | 3            |
| 157      | 38a   | Dismenorréia severa, dor pélvica acíclica leve, alterações intestinais e urinárias                        | Retossigmóide | 157                      | Padrão estromal misto de diferenciação | EDT profunda, com envolvimento da parede ate camada submucosa | EDT em ovário, bexiga, região peritônio-vesical; presença de aderências no intestino     | 4            |
| 169      | 30a   | Dor pélvica leve e acíclica, alterações e dores intestinais, dispareunia                                  | Retossigmóide | 169                      | Padrão estromal indiferente            | EDT profunda                                                  | EDT em ovário direito, peritônio, bexiga e apêndice; presença de aderências no intestino | 3            |
| 185      | 33a   | Dismenorréia e dor pélvica ausente, esterilidade primária, ausência de alterações intestinais e urinárias | Sigmóide      | 185                      | Padrão estromal misto de diferenciação | EDT profunda, com comprometimento da camada muscular interna  | EDT em retro-cervical, peritônio e região periuretral                                    | 1            |

Tabela 1. Continuação.

| Casos    | Idade | Sintomas clínicos                                                                                                      | Sítios de EDT | Identificação da amostra | Características Anatomopatológicas     | Profundidade anatomopatológica da lesão                      | Outros sítios de EDT e achados cirúrgicos                              | Estadiamento |
|----------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Grupo II |       |                                                                                                                        |               |                          |                                        |                                                              |                                                                        |              |
| 190      | 36a   | Dismenorréia incapacitante, esterilidade primária, sangramento intestinal, dispareunia                                 | Retossigmóide | 190                      | Padrão estromal misto de diferenciação | EDT profunda, com comprometimento de mucosa                  | EDT em ovário, íleo e região retro-cervical                            | 4            |
| 199      | 28a   | Dismenorréia severa, dor pélvica acíclica moderada, alterações intestinais, alterações urinárias cíclicas, dispareunia | Retossigmóide | 199                      | Padrão estromal misto de diferenciação | EDT profunda, com comprometimento da camada muscular externa | EDT em ovário, peritônio e região retro-cervical                       | 3            |
| 207      | 39a   | Dismenorréia incapacitante, esterilidade secundária, ausência de alterações intestinais                                | Retossigmóide | 207                      | NR                                     | EDT profunda                                                 | EDT em região retro-cervical                                           | 1            |
| 214      | 29a   | Dismenorréia leve, esterilidade primária, alterações e sangramento intestinais                                         | Retossigmóide | 214                      | Padrão estromal misto de diferenciação | EDT profunda, com envolvimento de submucosa                  | EDT em peritônio, bexiga e ureter; presença de aderências no intestino | 3            |

Tabela 1. Continuação.

| Casos    | Idade | Sintomas clínicos                                                               | Sítios de EDT | Identificação da amostra | Características Anatomopatológicas     | Profundidade anatomopatológica da lesão                         | Outros sítios de EDT e achados cirúrgicos | Estadiamento |
|----------|-------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------|
| Grupo II |       |                                                                                 |               |                          |                                        |                                                                 |                                           |              |
| 242      | 35a   | Dismenorréia severa, esterilidade e alterações intestinais                      | Retossigmóide | 242                      | Padrão estromal misto de diferenciação | EDT profunda                                                    | EDT em bexiga e peritônio                 | 2            |
| 243      | 39a   | Dismenorréia severa, esterilidade, alterações intestinais e dispareunia         | Retossigmóide | 243                      | Padrão estromal misto de diferenciação | EDT profunda                                                    | EDT em ovário, peritônio e bexiga         | 3            |
| 255      | 34a   | Dismenorréia moderada, pélvica acíclica leve, alterações intestinais e urinária | Retossigmóide | 255                      | Padrão estromal misto de diferenciação | EDT profunda, com envolvimento da parede até a camada submucosa | Tumor carcinóide no apêndice              | 1            |
| 256      | 32a   | Esterilidade primária, alterações intestinais, dispareunia                      | Retossigmóide | 256                      | Padrão estromal misto de diferenciação | EDT profunda, com comprometimento da camada submucosa           | EDT em ovário e região retro-cervical     | 4            |
| 264      | 29a   | Esterilidade, alterações intestinais e dispareunia                              | Retossigmóide | 264                      | Padrão estromal misto de diferenciação | EDT profunda, com comprometimento de muscular interna           | EDT em ovário, peritônio, bexiga e ureter | 4            |
| 302      | 30a   | Dismenorréia moderada, dor pélvica acíclica, alterações intestinais             | Retossigmóide | 302                      | Padrão estroma indiferenciado          | EDT profunda, com comprometimento de muscular interna           | EDT em bexiga e ureter                    | 3            |

EDT: endometriose; a: anos; NR: não referido.

### 3.2. Metodologias

#### 3.2.1. Grupo I

##### 3.2.1.1. Microdissecção a laser das amostras em blocos de parafina

Todas as 23 amostras FFEP do Grupo I foram submetidas à microdissecção a laser (LCM) para seleção e captura de células das lesões endometrióides. Para a microdissecção a laser, as biópsias incluídas em parafina passaram por cortes histológicos de 5-10 µm para a confecção de lâminas. Os procedimentos de retirada da parafina e coloração das lâminas, e a etapa de microdissecção a laser foram realizados conforme as recomendações de Coudry et al. (2007).

Os cortes contendo as lesões endometrióides foram microdissecados a laser com a utilização do aparelho *Pix Cell II Laser Capture Microdissection* (Arcturus, Inc, Califórnia, EUA), com a colaboração da Dra. Maria Aparecida Domingues, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, UNESP Botucatu, SP, e da Dra. Renata Coudry, Departamento de Anatomia Patológica, Hospital A. C. Camargo, São Paulo, SP. A região microdissecada foi fixada numa película do *cap* e colocada em *Eppendorf* de 0,5 mL para extração do DNA.

Durante os procedimentos de LCM, as células endometriais do estroma e epitélio foram microdissecadas separadamente quando presentes em quantidades representativas (Figura 4). Os detalhes do procedimento da microdissecção a laser bem como o tipo de célula capturada em cada amostra de EDT estão apresentados no Anexo 3.

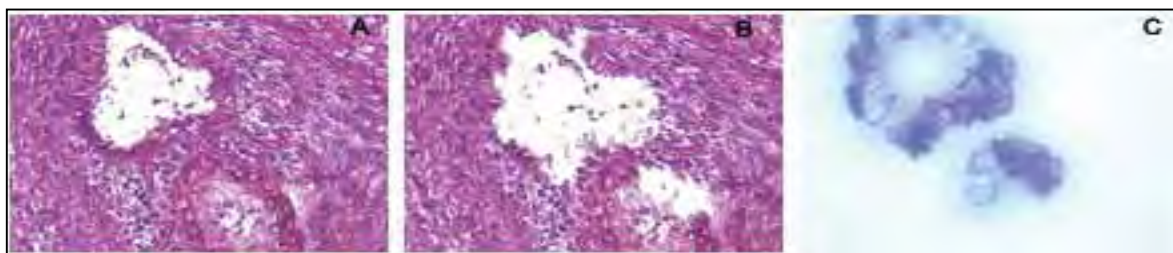


**Figura 4.** Microdissecção a laser de endométrio ectópico do caso FC03-0519, presente no ovário. (A) Foco de EDT demonstrando espessa camada de epitélio glandular; (B) Imagem da lesão após microdissecção do tecido epitelial; (C) Células epiteliais que foram capturadas e fixadas no cap.

### 3.2.1.2. Extração do DNA

Os diferentes tecidos resultantes da LCM das amostras do Grupo I foram submetidos à extração do DNA genômico. Para isso foi utilizado o *QIAamp DNA Mini Kit* (*Qiagen*), de acordo com as instruções do fabricante. Este método de extração é baseado na retenção de ácidos nucleicos em uma membrana de sílica. Em resumo, foi adicionado em cada tubo um tampão de lise celular (*ATL Buffer*) e a enzima proteinase K (600 mAU/ml, *Qiagen*). Após homogeneização, as amostras foram incubadas em banho-seco a 56°C a 450 rpm, por no mínimo 16 horas. Em seguida, foi adicionada uma alíquota do *AL Buffer* (fornecido pelo fabricante), carregador de RNA (*Qiagen*) e etanol absoluto gelado. A solução resultante foi transferida para uma coluna de sílica e centrifugada a 8.000 rpm por um minuto. A coluna foi submetida a duas etapas de lavagem com os tampões *AW1* (*Wash Buffer 1*) e *AW2* (*Wash Buffer 2*). O DNA genômico retido na coluna foi eluído pela adição de água ultra-pura estéril pré-aquecida a 45°C.

A quantidade e qualidade dos DNAs genômicos extraídos de cada amostra foram verificadas no *NanoDrop Spectrophotometer ND-1000* (*Nanodrop Technologies, USA*) e submetidos a reações de amplificação e marcação pela metodologia da SCOMP (*Single Cell Comparative Genomic Hybridization*).

### 3.2.1.3. SCOMP (*Single Cell Comparative Genomic Hybridization*)

#### *Primeira Amplificação por SCOMP*

Os DNAs genômicos obtidos (50 a 500 ng) foram diretamente utilizados na metodologia de SCOMP. As reações de clivagem com a endonuclease de restrição *MseI*, ligação dos adaptadores e primeira amplificação pela PCR foram realizadas mesmo tubo para prevenir a perda de fragmentos genômicos. Inicialmente, o DNA foi submetido à clivagem com 24U da endonuclease de restrição *MseI* (alta concentração, *New England Biolabs*), em tampão universal (10mM Tris-Acetato pH 7,5; 10mM Acetato de Magnésio; 50mM Acetato de Potássio) a 37°C durante 3 horas. A enzima foi inativada a 65°C durante 10 minutos.

Em um segundo tubo, os adaptadores foram formados pelo pareamento dos oligonucleotídeos LIB1 (5'-AGTGGGATTCCTGCTGTCAGT-3') e ddMseI (5'-TAACTGACAGCdd-3'). Uma solução contendo 15nM de cada oligonucleotídeo em tampão universal foi submetida a um gradiente decrescente de temperatura de 65°C a 15°C (1 minuto por °C). Após o pareamento dos oligonucleotídeos adaptadores, foram adicionados dATP 10mM e 5U de T4 DNA ligase (*Invitrogen- Life Technologies*). Esta mistura foi transferida ao DNA tratado com a endonuclease *MseI* e incubada a 15°C por 16 horas.

Após a ligação dos adaptadores aos fragmentos de DNA genômico, foi realizada a amplificação primária utilizando o *Expand Long PCR System (Roche)*. A reação foi realizada em um volume final de 41 µL contendo 2.5 mM de cada dNTP, *Expand Long Template Buffer 1*, *Expand Long Templat Pol Mix* 3,5 U/ µL e água ultra-pura estéril. A amplificação foi realizada em um termociclador programável PTC 200 (*MJ Research*) e consistiu de 1 ciclo de 68°C por 3 minutos; 15 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto e 30 segundos com 1 segundo adicional/ciclo; 8 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 30 segundos

com 1 segundo adicional/ciclo; 8 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 30 segundos com 1 segundo adicional/ciclo e 68°C por 1 minuto e 45 segundos, com 1 segundo adicional/ciclo; 22 ciclos de 94°C por 40 segundos, 65°C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto e 53 segundos com 1 segundo adicional/ciclo de 68°C por 3 minutos e 40 segundos. Em seguida, os produtos amplificados foram purificados usando o *QIAquick PCR Amplification Kit* (QIAGEN), conforme recomendações do fabricante.

#### *Incorporação de Nucleotídeos Marcados*

Dois µL do produto purificado foram utilizados como molde numa segunda reação de amplificação para marcação dos fragmentos. Brevemente, as reações foram realizadas utilizando o *Expand Long Template Buffer 1*, oligonucleotídeo LIB1 10 µM, 8,75 mM de 7/8 de uma mistura de nucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP a 10 mM cada, e dTTP a 5 mM), digoxigenina 11-dUTP (para o DNA de referência) ou biotina 16-dUTP (para o DNA teste), *Expand Long Templat Pol Mix* 5U/µL. Posteriormente, em todas as amostras, o oligonucleotídeo LIB1 foi removido pelo tratamento com a enzima de restrição *TruI*, conforme as instruções recomendadas pelo fornecedor. Em seguida, a enzima foi inativada a 65°C por 3 horas. A representação esquemática do princípio da metodologia da SCOMP está apresentada na Figura 5.

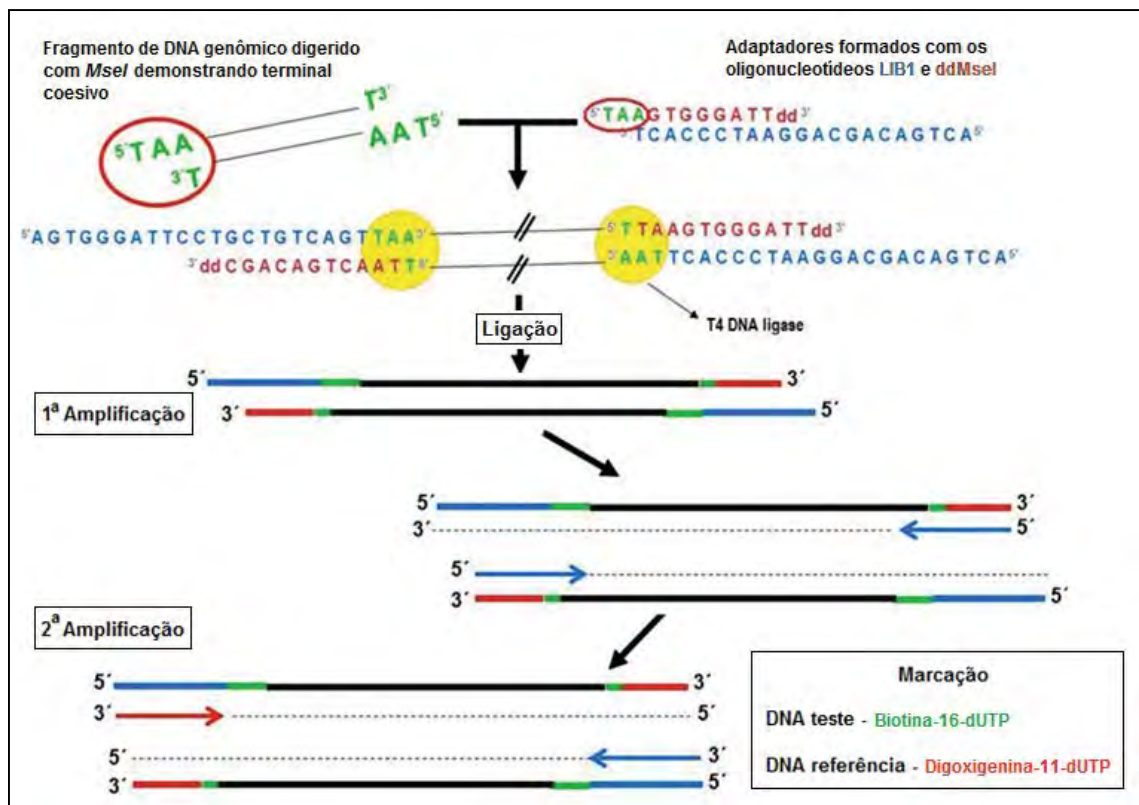


**Figura 5.** Representação esquemática da metodologia da SCOMP. Adaptadores de sequência conhecida (formados pelos oligonucleotídeos LIB1 e dd*MseI*) são acoplados aos terminais dos fragmentos de DNA genômico gerados após digestão com enzima de restrição *MseI*. Essa união é possibilitada pela existência de terminais coesivos entre os adaptadores e os fragmentos de DNA, como também pela ação da enzima T4 DNA ligase, que sela essa ligação. A presença dos adaptadores permite a amplificação e marcação dos fragmentos genômicos com alta eficiência. Esses procedimentos foram realizados para os DNAs genômicos teste (marcado com Biotina-16-dUTP) e referência (marcado com Digoxigenina-11-dUTP).

### 3.2.1.4. Hibridação Genômica Comparativa - CGH

#### *Hibridação e Lavagens*

Alíquotas contendo 8µg de DNA teste (marcado com biotina 16-dUTP) e 8µg de DNA de referência (marcado com digoxigenina 11-dUTP) foram co-precipitadas na presença de *Human Cot-1 DNA (Invitrogen)* e de DNA de espermatozoides de salmão. Para precipitação, foram também adicionados acetato de sódio 3M e etanol absoluto

gelado. A amostra foi incubada a -20°C durante 12 horas. Após centrifugação a 14000 rpm, a 4°C por 45 minutos, o precipitado foi lavado em etanol 70%, centrifugado e seco em temperatura ambiente.

Posteriormente, os DNAs genômicos marcados foram desnaturados utilizando *Hybrisol VII* à 75°C por 10 minutos. Em seguida, o precipitado foi mantido à 37°C por, no mínimo, 1h para pré-anelar.

Para a HR-CGH, foram utilizadas lâminas contendo preparações celulares ricas em metáfases obtidas a partir da cultura de linfócitos (Moorhead et al., 1960). As lâminas têm, em média, 30 dias de estocagem em temperatura ambiente. Previamente a hibridação, as lâminas contendo as preparações cromossômicas foram desidratadas em série de etanol 70%, 80% e 90% por 5 minutos cada, e secas a temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas foram incubadas em solução de 0,01N HCl e 10% de pepsina a 37°C e novamente desidratadas em série de etanol. Em seguida, as preparações cromossômicas foram desnaturadas em solução de 70% formamida/2XSSC a 72°C por aproximadamente 2 minutos. Após a desnaturação, procedeu-se imediatamente a nova desidratação em uma série de etanol 70%, 80% e 90% gelado por 5 minutos cada, seguidas por secagem a temperatura ambiente.

A hibridação foi realizada pela adição da sonda sobre as preparações cromossômicas, sob lamínula vedada com *rubber cement*, seguida de incubação em câmara úmida e escura por 72 horas a 37°C. Posteriormente, foi realizada a lavagem das lâminas para remoção das marcações inespecíficas. Resumidamente, as lâminas foram lavadas em solução de 50% formamida/2XSSC por 5 minutos a 45°C (duas vezes). Em seguida, incubadas com as soluções *Block I* (0,1M Tris-HCl; 0,15M NaCl; 0,5% BSA – *Boehringer, Mannheim, Germany*) e TNB (0,1% Tween 20; 3% BSA; 4XSSC) por 30 minutos a 37°C. O DNA biotilado foi detectado utilizando

avidina-fluoresceína isotiocianato (FITC – *Roche*), enquanto o DNA marcado com digoxigenina foi detectado pelo uso de anti-digoxigenina-rodamina (*Boehringer, Mannheim, Germany*), na proporção 9:1. As lâminas foram sobrepostas com lamínula e incubadas em câmara escura durante 30 minutos a 37°C. Procedeu-se nova etapa de lavagem com solução de 2XSSC/0,1% Tween 20 a 45°C durante 5 minutos (quatro vezes). A contra-coloração das lâminas foi realizada utilizando DAPI/Antifade (*Vector*).

#### *Análise da HR-CGH*

O sistema HR-CGH da *Applied Spectral Imaging (Version 4.0)* foi utilizado para captura e análise da imagem. Com este *software* a razão da intensidade de fluorescência rodamina:FITC foi expressa como uma razão vermelho/verde. As regiões cromossômicas de ganhos e perdas foram definidas baseando-se em uma biblioteca de amostras normais, construída a partir da marcação reversa (biotina e digoxigenina), utilizando-se DNA masculino (*Invitrogen*) e feminino (*Invitrogen*) com um limite de confiança de 99.5%. Foram capturadas e analisadas 150 metáfases para a construção da biblioteca de referência. Os intervalos de referência são extraídos da biblioteca que delimita o padrão normal dos experimentos considerando os mesmos critérios de seleção de metáfases, padrão de hibridação e condições gerais de análise pré-estabelecidas. O intervalo de referência é assinalado em azul e representa o intervalo de confiança das amostras normais. As barras indicando perdas (vermelho) e ganhos (verde) aparecem quando o intervalo de referência da amostra não se sobrepõe ao do intervalo de referência da biblioteca.

O arquivo gerado da biblioteca de casos normais foi utilizado na comparação de cada um dos casos. Para cada caso, foram capturadas 20-25 metáfases, analisadas por bandamento G reverso numa resolução. Os cromossomos para a análise tinham

aproximadamente 600-800 bandas sendo selecionadas as metáfases com cromossomos não sobrepostos. Na análise do perfil de interpretação para ganhos e perdas foram consideradas somente células que mostraram um padrão homogêneo de hibridação (em média 15 a 18 células). Ao final da análise, todas as metáfases capturadas foram agrupadas e identificadas as regiões alteradas como significantes. Um esquema ilustrativo das amostras coletadas de cada paciente assim como do tipo celular avaliado investigado por HR-CGH esta apresentado na Figura 6.

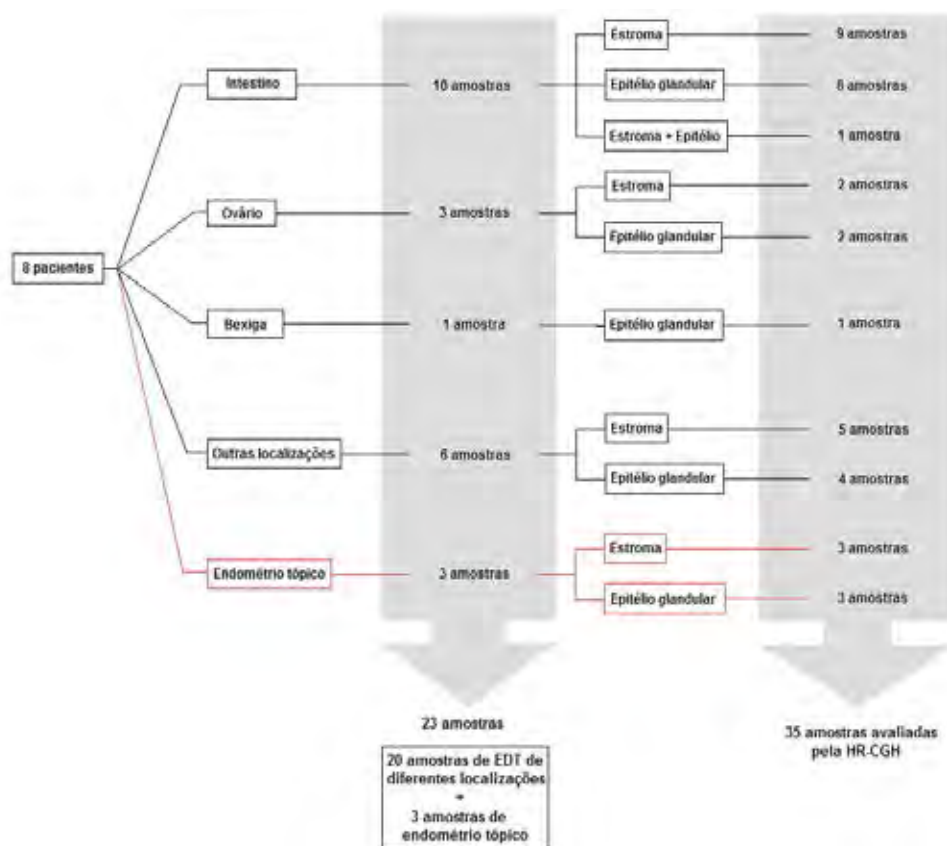


**Figura 6.** Caracterização das amostras de EDT do **Grupo I** que foram avaliadas pela metodologia de HR-CGH. Em vermelho, estão destacadas as amostras de endométrio típico provenientes de três pacientes.

### 3.2.1.5. Análise de expressão protéica de marcadores de célula-tronco pela metodologia de imuno-histoquímica

As expressões das proteínas CD9, CD13, CD24, CD34, CD117/c-Kit, CD133 e Oct-4 foram avaliadas em 20 amostras de EDT de diferentes sítios e em três amostras de endométrio eutópico do Grupo I. As amostras FFEP foram cortadas em lâminas de 3mm para a realização das reações imuno-histoquímicas (IHQ) (Tabela 2). Os cortes foram submetidos a tratamento com xilol para a retirada da parafina em três banhos de cinco minutos a temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram hidratados em soluções com concentrações decrescentes de etanol (100%, 90%, 70% e 50%) e posteriormente lavados em água corrente e destilada, como também em solução salina tamponada com fosfatos (*PBS - phosphate buffered saline*) 10mM pH 7.4 por 5 minutos cada. Exclusivamente, para o marcador CD9, os cortes foram incubados em solução fervente de Tris - EDTA 1 mM pH 9.0 previamente à lavagem com solução de PBS. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10V) 5 minutos a temperatura ambiente. Após o bloqueio da peroxidase as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em títulos pré-estabelecidos (Tabela 2) em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (*Sigma*, A9647, EUA) e azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

Os cortes foram lavados em PBS e, em seguida, incubados com o anticorpo biotinilado secundário (*Advance™ HRP Link* - Dako, Carpinteria, CA, EUA) e, posteriormente, com o complexo peroxidase estreptoavidina (*Advance™ HRP Enzyme* - Dako, Carpinteria, CA, EUA), por 30 minutos cada, a 37°C. Após nova etapa de lavagem das lâminas com solução de PBS, a reação foi revelada com o cromógeno 3-3'-diaminobenzidina tetrahydrochloride (DAB) 100 mg (*Sigma*, D-5637, EUA), contra-corada com hematoxilina de Harris, desidratadas e montadas com lamínula. Lâminas para controle positivo (tonsilas) foram incluídas em cada ensaio. Como controle negativo, procedimentos de IHQ foram realizados com a omissão do anticorpo primário. A leitura foi

feita em microscópico óptico biocular pelas patologistas Prof. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues e Prof. Dra. Renée Laufer Amorim.

**Tabela 2.** Características dos anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica nas amostras do Grupo I.

| Anticorpos  | Clones                     | Títulos | Fabricantes                           |
|-------------|----------------------------|---------|---------------------------------------|
| CD9         | 72F6                       | 1:100   | Neomarkers                            |
| CD13        | 38C12                      | 1:40    | Neomarkers                            |
| CD24        | SN3                        | 1:50    | Neomarkers                            |
| CD34        | QBEnd10                    | 1:100   | DakoCytomation Glostrup,<br>Dinamarca |
| CD117/c-Kit | Policlonal feito em coelho | 1:600   | DakoCytomation Glostrup,<br>Dinamarca |
| CD133       | Policlonal feito em coelho | 1:100   | Abcam                                 |
| Oct-4       | BOB1                       | 1:150   | Santa Cruz                            |

### 3.2.2. Grupo II

Baseado no poder de resolução da aCGH e na importância da triagem de CNVs em doenças genéticas, esta metodologia foi realizada para análise de alterações no número de cópias de DNA genômico no grupo de amostras de pacientes com EDT intestinal profunda.

#### 3.2.2.1. Microdissecção manual

Devido à grande heterogeneidade do tecido endometriótico, amostras de EDT congeladas foram microdissecadas manualmente com o auxílio de um criostato (Leica) de acordo com protocolo descrito por Pires et al. (2006), com modificações. Este procedimento foi realizado junto ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, com a supervisão do médico patologista Alexandre Fabro. Foram confeccionadas agulhas especiais com o auxílio de uma microretífica. O bisel foi retirado para se formar uma extremidade reta e uma “janela” foi aberta na lateral da agulha a aproximadamente 1-2mm da sua extremidade. As regiões contendo as lesões endometrióticas no tecido intestinal foram demarcadas após o preparo de lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Posteriormente o bloco de tecido congelado foi microdissecado com o auxílio destas agulhas. O tecido foi, então, retirado pela lateral da agulha e introduzido em microtubos de 0,5mL para extração do DNA genômico. Novas lâminas foram preparadas para a confirmação da microdissecção apenas das lesões endometrióticas (Figura 7).

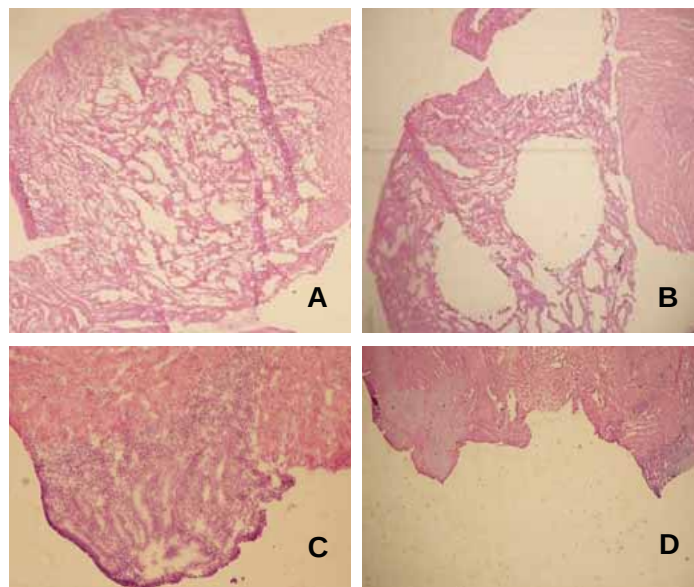


**Figura 7.** Fotomicrografias das lesões dos casos 157 e 255 antes e após microdissecção (10xIMH). Antes da microdissecção, as lâminas dos casos 157 e 255 foram confeccionadas para determinar a localização da lesão (A e C, respectivamente). Após a microdissecção, novas lâminas foram fabricadas e coradas para confirmar a retirada da área contendo as lesões de cada caso (B referente ao caso 157 e C referente ao caso 255).

### 3.2.2.2. Obtenção do DNA genômico

A extração do DNA nas dezoito amostras do **Grupo II** (amostras a fresco) foi conduzida pela desagregação mecânica e enzimática adicionando-se proteinase K (*Invitrogen*) na concentração final de 100µg/ml (dependendo do tamanho do fragmento), tampão de extração (100mM de Tris pH 8,0; 50mM de EDTA e 500mM de NaCl) e SDS (ou Dodecil Sulfato de Sódio) 20%, completando um volume final de 500µL. Após homogeneização, as amostras foram incubadas em banho-Maria a 37°C, 18 horas, até a dissolução completa do tecido.

Após a digestão protéica, foi realizada a extração padrão com solventes orgânicos. Foi adicionado um volume igual de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) seguido de homogeneização por um minuto e centrifugação a 14000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Este passo foi novamente realizado após o tratamento com RNase A (*Epicentre Biotechnologies*) na concentração de 40mg/mL durante 1 hora a 37°C. O sobrenadante foi novamente transferido para um novo tubo e a este foi adicionado um igual volume de clorofórmio. Novamente foi feita a homogeneização por 1 minuto e centrifugação a 14000 rpm por 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e o volume da amostra foi estimado. O DNA foi precipitado adicionando-se aproximadamente 10% deste volume de acetato de amônio 7,5M e 2 a 3 volumes de etanol absoluto gelado. O microtubo foi mantido à -20°C 18 horas ou à -80°C durante 1 hora. Em seguida, o material foi centrifugado a 14000 rpm durante 15 minutos e depois de descartado o sobrenadante, o *pellet* foi lavado com etanol 70%, secado em temperatura ambiente e ressuspendido em água ultra-pura estéril, sendo posteriormente armazenado a -20°C. A quantidade e a qualidade do DNA isolado foram avaliadas pela leitura em espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* e corrida em gel de agarose 0.8% (Figura 8).

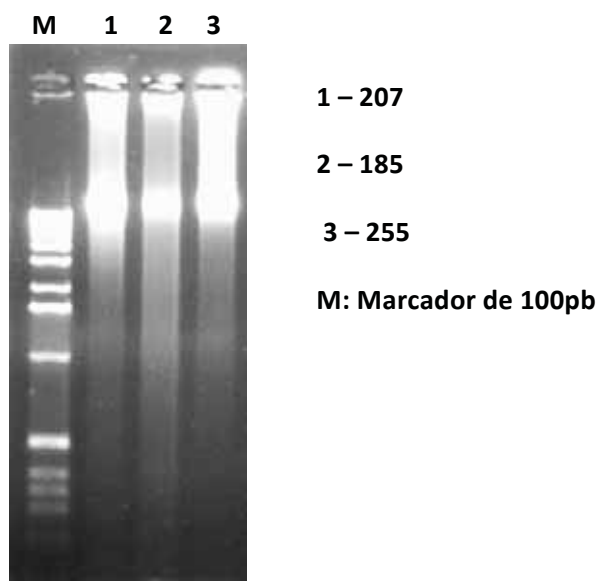


**Figura 8.** Eletroforese em gel de agarose 0.8% de DNA genômico extraído (200ng) das amostras microdissecadas. Os DNAs genômicos obtidos são de alto peso molecular e de alta qualidade.

### 3.2.2.3. Experimento da aCGH

Os experimentos da aCGH foram realizados utilizando a plataforma 4x44K da *Agilent®* Technologies. Trata-se de uma plataforma de oligonucleotídeos de 60pb e uma resolução de 44Kb; possui aproximadamente 44.000 sondas (com distância média entre sondas de ~74Kb) que mapeiam genes bem caracterizados, particularmente envolvidos no câncer, e mais seqüências codificadoras e não-codificadoras (<http://www.chem.agilent.com>). Foi utilizado como referência DNA genômico feminino universal (*Promega*). As amostras foram submetidas a uma etapa de digestão enzimática randômica em reação contendo água ultra-pura estéril; tampão de reação 10x; BSA; e enzimas *Alu* I e *Rsa* I totalizando 26µl. As reações foram incubadas a 37°C por 2hs, 65°C por 20min e mantidas em gelo durante o procedimento. Em seguida, os DNAs teste e referência foram marcados diferencialmente por com Cy3 e Cy5 dCTPs, respectivamente, em uma reação baseada no uso de iniciadores randômicos e na atividade da enzima *Exo-Klenow* (*BlueGnome Ltd, Cambridge, UK*). A reação de marcação foi realizada a 37°C por 2hs, 65°C por 10min e, em seguida, foram purificadas de acordo com as

instruções do fabricante e eluídas em TE (tampão Tris-EDTA) 1x pH 8.0. Os procedimentos de hibridação e lavagem seguiram as recomendações do fabricante (*Agilent Technologies*). As lâminas foram escaneadas utilizando o *Agilent DNA Scanner* e os dados foram extraídos pelo programa *Feature Extraction v 10.1.1.1* (*Agilent Technologies*).

### **Análise dos dados de CGH array**

Os dados foram analisados utilizando o programa *Nexus Copy Number version 5.0* (*Biodiscovery*), o qual permite a identificação de regiões genômicas envolvidas em alterações estruturais (ganhos, alto nível de ganhos, perdas heterozigotas e homozigotas) e a integração desses dados com informações clínicas.

A seleção dos casos foi realizada de acordo com o preenchimento dos critérios de qualidade determinados pelo *software* (valores até 0,3). Foi utilizado o algoritmo *RANK Segmentation* (baseado no algoritmo de Segmentação Binária Circular, em que os valores das sondas são ranqueados para minimizar o efeito de *outliers* e melhorar a desempenho da análise), *threshold* de significância de 1,00E-4 e máximo espaçamento entre sondas adjacentes antes de realizar a quebra de um segmento de 1Mb. Foram consideradas três sondas consecutivas alteradas para a determinação de um segmento como alterado quanto ao número de cópias. Os limiares considerados para ganhos de uma cópia, ganhos de 2 ou mais cópias (alto nível de ganhos), perdas de uma cópia e perdas de duas cópias (deleção homozigota) foram 0,2; 0,6; -0,2 e -1,0, respectivamente. As alterações detectadas no cromossomo X foram mantidas. As amostras foram agrupadas com a utilização do algoritmo *Complete Linkage Hierarchical*.

A seleção de regiões para análises mais detalhadas baseou-se na inclusão de alterações presentes em mais de 20% dos casos. Essas regiões foram comparadas a CNVs (do inglês, *copy number variation*) descritas previamente para um grupo de 82 mulheres saudáveis da população brasileira; as alterações comuns presentes em mais que 5% dessa população foram excluídas da análise. Este critério foi baseado na

descrição de que 80% das diferenças no número de cópias entre pares de indivíduos ocorrem devido a CNVs comuns com uma frequência alélica >5% (McCarroll et al., 2008).

A comparação entre a extensão de ganhos e perdas genômicas entre todos os casos avaliados, bem como entre os grupos com doença moderada e severa e nos diferentes *clusters* definidos pelo agrupamento hierárquico foram realizadas com utilização do teste de Mann-Whitney no programa *Graphpad Prism 5* (*Graphpad Software Inc.*).

Genes envolvidos nas regiões alteradas em mais de 20% dos casos foram submetidos à análise de redes, vias gênicas, doenças relacionadas e função celular ou molecular com a utilização do programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (*Ingenuity Systems*). Os scores para cada item foram calculados pelo teste exato de Fischer e são iguais a  $-\log(\text{valor de } P)$ . Genes importantes da via e suas relações foram abordados com maior foco e são potenciais candidatos a validação futura.

**Resultados**



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise das alterações genômicas pela HR-CGH - Grupo I

Para a análise de HR-CGH, os limiares para considerar perdas e ganhos foram baseados no padrão obtido em uma biblioteca de casos normais, utilizando DNA normal de referência comercial (*Promega*) marcado diferencialmente, hibridado e analisado, seguindo os mesmos parâmetros utilizados nos casos avaliados. Cada metáfase foi analisada individualmente para a obtenção do perfil genômico, sendo depois obtido o perfil final que incluía todas as metáfases analisadas para o caso em questão. Foram eliminados da análise cromossomos com *background*, sobrepostos ou com marcação irregular quando comparados aos demais da mesma metáfase. Aproximadamente 30 metáfases para cada caso foram capturadas e analisadas em DAPI reverso. Em média, 16 metáfases foram usadas para obtenção do perfil de interpretação final. A Figura 9 exemplifica o padrão de hibridação e qualidade das metáfases analisadas.

Um total de 20 amostras de lesões de EDT de diferentes sítios anatômicos foi avaliada. O número médio de alterações por caso foi 68. Especificamente, a média de ganhos foi de 27,7/caso e de perdas genômicas foi de 40,7/casos. As regiões cromossômicas contendo desequilíbrios genômicos resultantes da análise de HR-CGH para todas as amostras de EDT estão apresentados em tabela, no Anexo 1. O perfil genômico de amostras do endométrio típico disponíveis de três casos do **Grupo I** (FC04-1080 EU, FC04-1132 EU e FC04-1181 EU) também foi avaliado pela HR-CGH. Nestas amostras, os componentes epiteliais e estromais também foram analisados individualmente. Nas seis amostras avaliadas (três do componente estromal e três do epitélio endometrial), a análise da HR-CGH revelou a ausência de alterações genômicas em cada tipo celular.

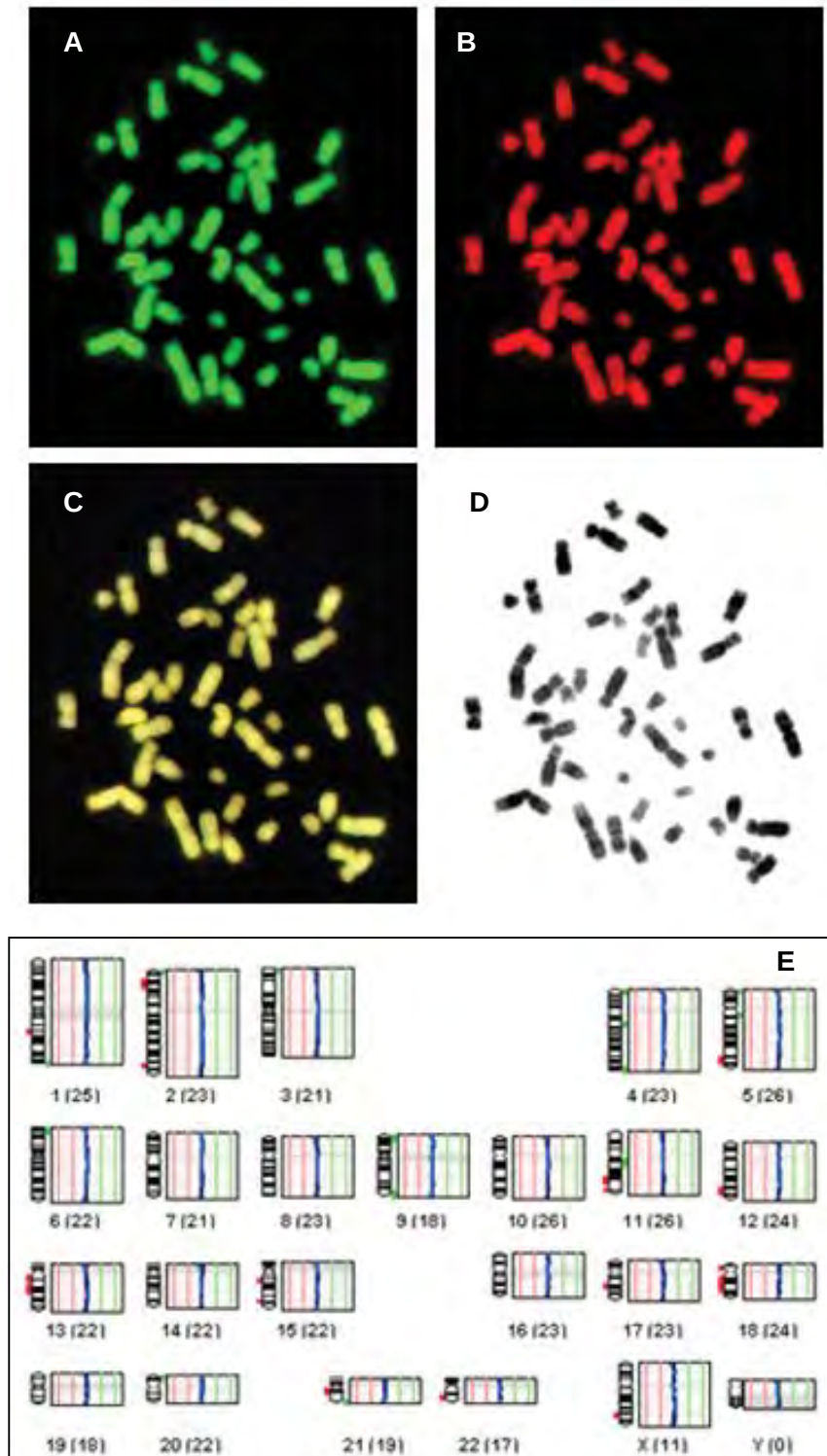


**Figura 9.** Padrão de marcação da HR-CGH para a amostra de EDT em sigmóide do caso FC03-1965 microdissecada no componente epitelial e marcada pela metodologia de *SCOMP*. A) Imagem capturada com filtro no espectro verde. B) No espectro vermelho. C) Com filtro triplo. D) Padrão de Banda G (DAPI-reverso). E) Perfil médio da HR-CGH. O desvio da linha azul para a esquerda indica perda (vermelho) e para a direita indica ganho (verde). Entre parênteses ao lado do número do cromossomo é indicado o número de cromossomos totais analisados que resultaram no perfil obtido.

Neste estudo, componentes epiteliais e estromais das lesões EDT (15 amostras do componente estromal e 16 do epitélio glandular) foram analisados individualmente pela HR-CGH para a identificação de regiões mínimas de alterações genômicas presentes em cada tipo celular. As regiões mínimas de perdas e ganhos detectadas no estroma e epitélio glandular em comparação com a biblioteca de casos normais estão apresentadas na Tabela 3. As alterações detectadas em cada lesão estão apresentadas no Anexo 1.

**Tabela 3.** Regiões mínimas de perdas e ganhos genômicas de diferentes lesões de EDT, considerando a análise separada dos componentes epiteliais e estromais.

| Tipo de Alteração | Estroma*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Epitélio**                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ganhos</b>     | 1p12-p21; 1p22; 1q21-q23; 2p11.2-p12; 2q11.2-q13; 2q14.1-q14.3; 2q21-q23; 2q24; 3p12-p13; 3p14-p21; 3q12-q13.3; 4q12-q13; 4q21-q22; 4q24-q26; 4q27-q28; 5p12-p13; 5q11.2-q13; 5q14-q21; 6p12-p21.1; 6q12-q15; 6q16-q21; 7q11.2-q22; 8q11.2-q13; 9p12-p13; 10q11.2; 11p11.2-p12; 11q12-q13; 12p11.2; 12q12-q13; Xp11.2; Xq12-q21                                                                                                                                                                    | 1q21-q24; 2p11.2-p12; 2q11.2-q12; 2q22-q23; 3p21; 3q12-q13.1; 4p12-p13; 5q11.2-q13; 7q11.2; 11p11.2-p12; 11q12-q13                                                                                                                                                                                                            |
| <b>Perdas</b>     | 1p32-p33; 1p34.2-p35; 1p36.1-p36.3; 1q32; 1q41-q44; 2p21-p24; 2q35-q37; 3p23-p26; 3q26.3-q29; 4p15.1-p16; 4q31.3; 4q32-q35; 5p15.1-p15.3; 5q31; 5q32-q35; 6q24-q27; 7p14-p22; 7q32-q36; 8p21-p23; 8q23-q24.1; 8q24.2-q24.3; 9p21-p23; 9q31-q34; 10q24-q26; 11q23-q25; 12p12-p13; 12q22-q24.3; 13q22-q31; 13q32; 14q24-q32; 15q23-q26; 16p12-p13.3; 16q21-q24; 17q21-q25; 18p11.2-p11.3; 18q12; 18q21-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.1; 21q22; 22q12-q13; Xp22.1; Xq27 | 1q32-q43; 2p21-p25; 2q35-q36; 3p24-p25; 4p15.3; 4q33; 5q32-q35; 6p23; 6q24; 7p14-p21; 7q33-q35; 8q23-q24.3; 9p21-p22; 9q31; 9q34; 10q24-q26; 11q23-q24; 12p12; 12q23-q24.3; 13q21-q22; 15q25; 16p12-p13.2; 16q22-q24; 17q24-q25; 18p11.2-p11.3; 18q12-q21; 18q22-q23; 19q13.1-q13.3; 20p12; 20q13.1-q13.2; 21q22; 22q13; Xq25 |

\*Alterações presentes em >47% das amostras de estroma, total de 15 amostras.

\*\*Alterações presentes ≥50% das amostras de epitélio, total de 16 amostras.

Amostras consideradas para o estroma (FC01-0189 SE, FC03-0248 RSE, FC03-0519 OE, FC03-0519 SE, FC03-1965 SE, FC03-1965 VE, FC04-1080 OE, FC04-1080 IE, FC04-1080 PTE, FC04-1080 RS-I E, FC04-1080 RS-II E, FC04-1132 RSE, FC04-1132 RCE, FC04-1132 LRE e FC04-1181 SE) e para o epitélio (FC01-0189 OEG, FC01-0189 SEG, FC03-0248 BEG, FC03-0248 RSEG, FC03-0248 REG, FC03-0519 SEG, FC03-1465 PEG, FC03-1965 SEG e FC04-1080 OEG, FC04-1080 IE, FC04-1080 PTEG, FC04-1080 RS-I EG, FC04-1080 RS-II EG, FC04-1132 RSEG, FC04-1132 RCEG e FC04-1181 SEG).

A análise comparativa entre as regiões mínimas presentes no epitélio e estroma das lesões EDT revelou que as perdas foram mais prevalentes nos dois componentes. Entretanto, a frequência de regiões cromossômicas envolvidas em ganhos foi significativamente maior no componente estromal (epitélio/estroma, 11/31). A maioria das regiões genômicas com alteração no número de cópias de DNA foi comum para os dois tipos de células e incluíram principalmente os segmentos cromossômicos 5q34, 9p21, 16q22-q23 e 19q13.3. As alterações exclusivas foram detectadas em menor frequência, sobretudo no componente estromal, e envolveram principalmente ganhos nos cromossomos 1p, 2q, 4q, 5, 6, 8q, 9p, 10p, 12 e X. Em menor número, as perdas genômicas exclusivas do estroma foram identificadas nos braços cromossômicos 1p, 3q, 4q, 5p, 5q, 8p, 13q, 14q, 18q, 19p, Xp e Xq. As alterações características do epitélio foram observadas em baixa frequência e envolveram perdas em 6p, 13q e Xq, e ganho em 4p. O ideograma final representativo de todas as alterações genômicas significativas no estroma e epitélio estão apresentados na Figura 10. As regiões mínimas com alterações exclusivas de cada componente celular endometrial observadas neste estudo estão detalhadas na Tabela 4.

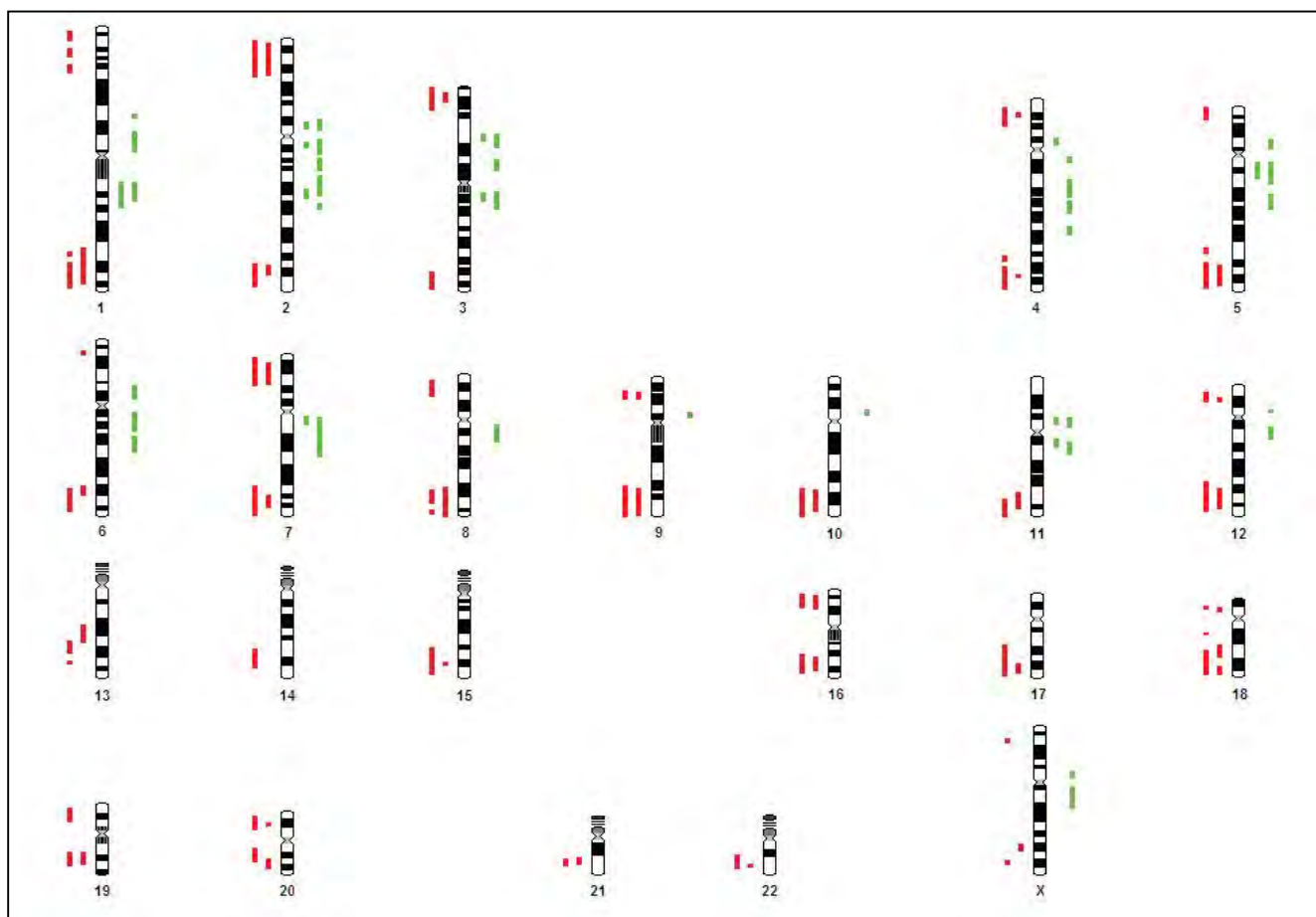


**Figura 10.** Caracterização das regiões mínimas alteradas identificadas pela HR-CGH ( $P<0,05$ ) no estroma e epitélio de EDT de diferentes sítios. As barras à esquerda indicam perda (vermelho) e a direita indicam ganho (verde). A ordem dos componentes a partir do cromossomo: epitélio e estroma.

**Tabela 4.** Regiões mínimas exclusivas de perdas e ganhos genômicos de cada componente celular (estroma e epitélio) de diferentes lesões de EDT.

| Tipo de Alteração | Estroma*                                                                                                                                                                                                                  | Epitélio**                  |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| <b>Ganhos</b>     | 1p12-p21; 1p22; 2q14.1-q14.3; 2q24; 3p14-p21; 4q12-q13; 4q21-q22; 4q24-q26; 4q27-q28; 5p12-p13; 5q14-q21; 6p12-p21.1; 6q12-q15; 6q16-q21; 7q11.2-q22; 8q11.2-q13; 9p12-p13; 10q11.2; 12p11.2; 12q12-q13; Xp11.2; Xq12-q21 | 4p12-p13                    |
| <b>Perdas</b>     | 1p32-p33; 1p34.2-p35; 1p36.1-p36.3; 3q26.3-q29; 4q31.3; 5p15.1-p15.3; 5q31; 8p21-p23; 13q22-q31; 13q32; 14q24-q32; 18q12; 19p13.1-p13.3; Xp22.1; Xq27                                                                     | 6p23; 6q24; 13q21-q22; Xq25 |

\*Alterações presentes em >47% das amostras de estroma, total de 15 amostras.

\*\*Alterações presentes ≥50% das amostras de epitélio, total de 16 amostras.

Amostras consideradas para o estroma (FC01-0189 SE, FC03-0248 RSE, FC03-0519 OE, FC03-0519 SE, FC03-1965 SE, FC03-1965 VE, FC04-1080 OE, FC04-1080 IE, FC04-1080 PTE, FC04-1080 RS-I E, FC04-1080 RS-II E, FC04-1132 RSE, FC04-1132 RCE, FC04-1132 LRE e FC04-1181 SE) e para o epitélio (FC01-0189 OEG, FC01-0189 SEG, FC03-0248 BEG, FC03-0248 RSEG, FC03-0248 REG, FC03-0519 SEG, FC03-1465 PEG, FC03-1965 SEG e FC04-1080 OEG, FC04-1080 IEG, FC04-1080 PTEG, FC04-1080 RS-I EG, FC04-1080 RS-II EG, FC04-1132 RSEG, FC04-1132 RCEG e FC04-1181 SEG).

Foram realizadas análises comparativas das alterações presentes em diferentes sítios de EDT da mesma paciente (casos FC01-0189, FC03-0248, FC03-0519, FC03-1965, FC04-1080 e FC04-1132). Nesta análise, os componentes estromais e epiteliais não foram avaliados separadamente já que os dois tipos celulares nem sempre estavam presentes em todas as lesões. Em todos os casos, foi observada uma alta frequência de alterações em regiões genômicas comuns entre os diferentes sítios de EDT analisados (Figuras 11, 12, 13, 14, 15 e 16).

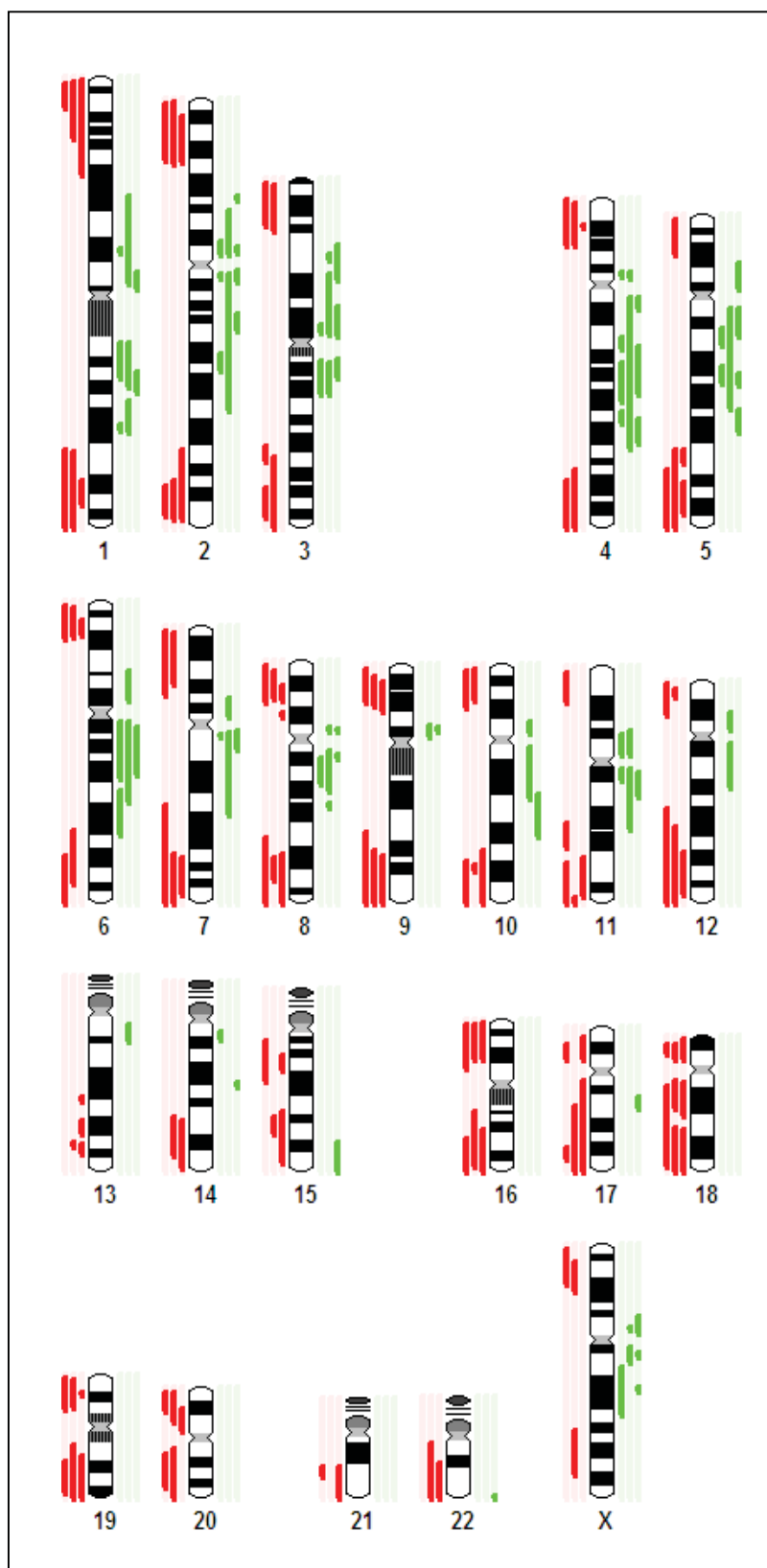


**Figura 11.** Comparação das regiões mínimas alteradas identificadas pela HR-CGH ( $P<0,05$ ) no estroma e epitélio de duas amostras de EDT de diferentes sítios (ovário e sigmóide) do caso FC01-0189. As barras à esquerda indicam perda (vermelho) e à direita indicam ganho (verde). A ordem das amostras, a partir do cromossomo: FC01-0189 OEG, FC01-0189 SE e FC01-0189 SEG.

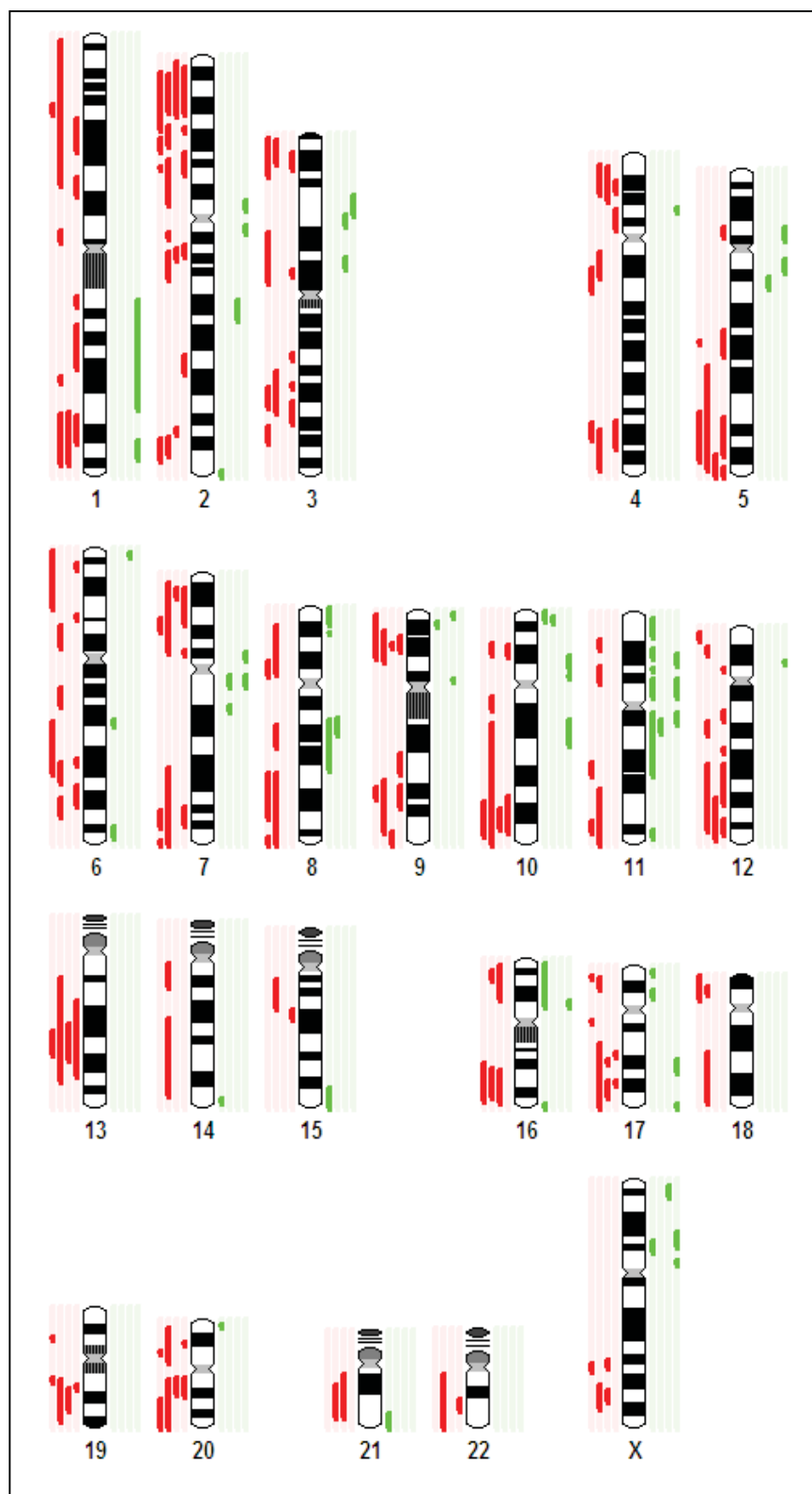


**Figura 12.** Comparação das regiões mínimas alteradas identificadas pela HR-CGH ( $P < 0,05$ ) no estroma e epitélio de três amostras de EDT de diferentes sítios (bexiga, reto e retossigmoide) do caso FC03-0248. As barras à esquerda indicam perda (vermelho) e à direita indicam ganho (verde). A ordem das amostras, a partir do cromossomo: FC03-0248 REG, FC03-0248 BEG, FC03-0248 RSE, FC03-0248 RSEG.

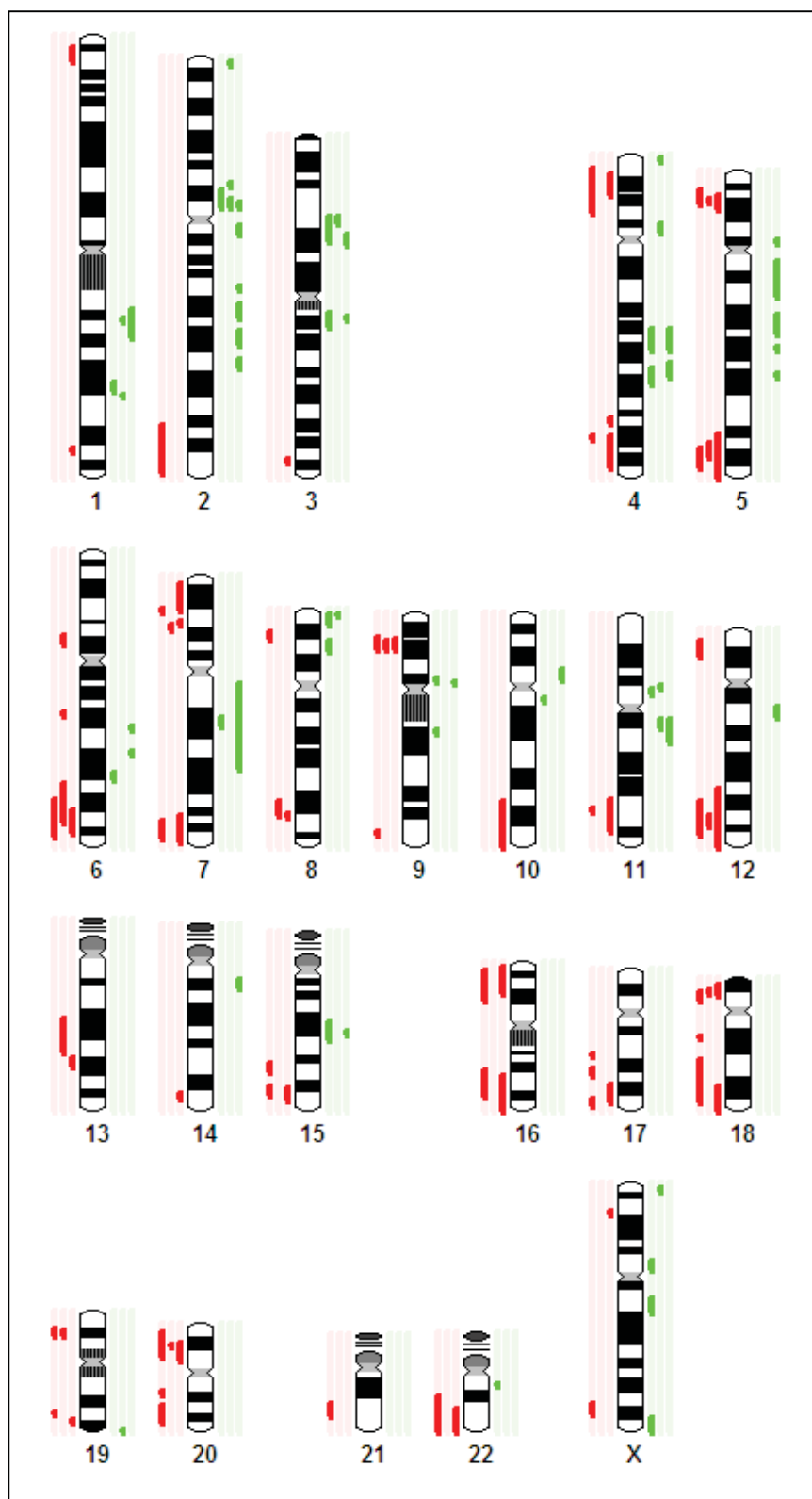


**Figura 13.** Comparação das regiões mínimas alteradas identificadas pela HR-CGH ( $P<0,05$ ) no estroma e epitélio de duas amostras de EDT de diferentes sítios (ovário e sigmóide) do caso FC03-0519. As barras à esquerda indicam perda (vermelho) e à direita indicam ganho (verde). A ordem das amostras, a partir do cromossomo: FC03-0519 SE, FC03-0519 SEG e FC03-0519 OE.

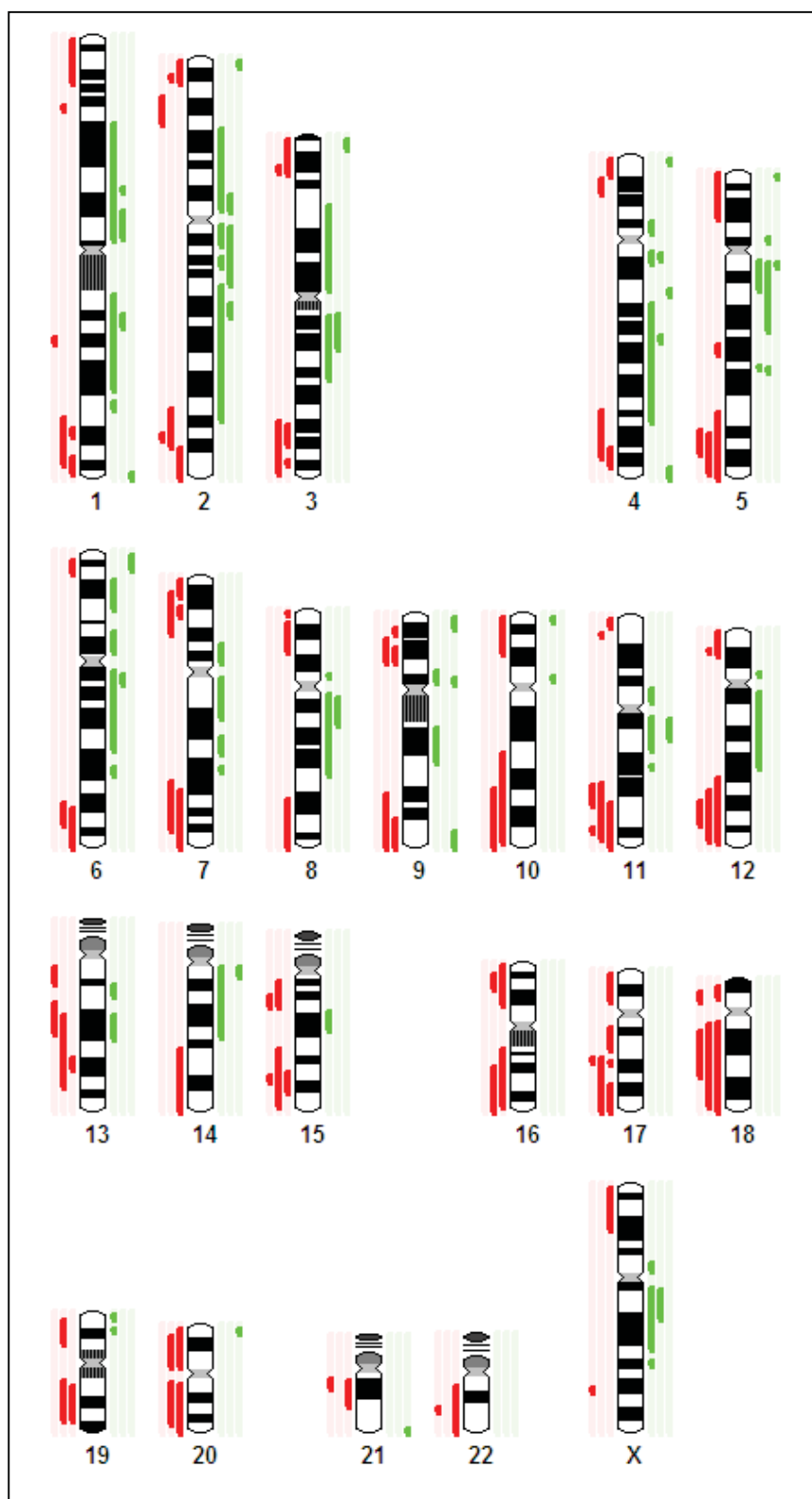


**Figura 14.** Comparação das regiões mínimas alteradas identificadas pela HR-CGH ( $P<0,05$ ) no estroma e epitélio de duas amostras de EDT de diferentes sítios (vesical e sigmóide) do caso FC03-1965. As barras à esquerda indicam perda (vermelho) e à direita indicam ganho (verde). A ordem das amostras, a partir do cromossomo: FC03-1965 VE, FC03-1965 SE e FC03-1965 SEG.

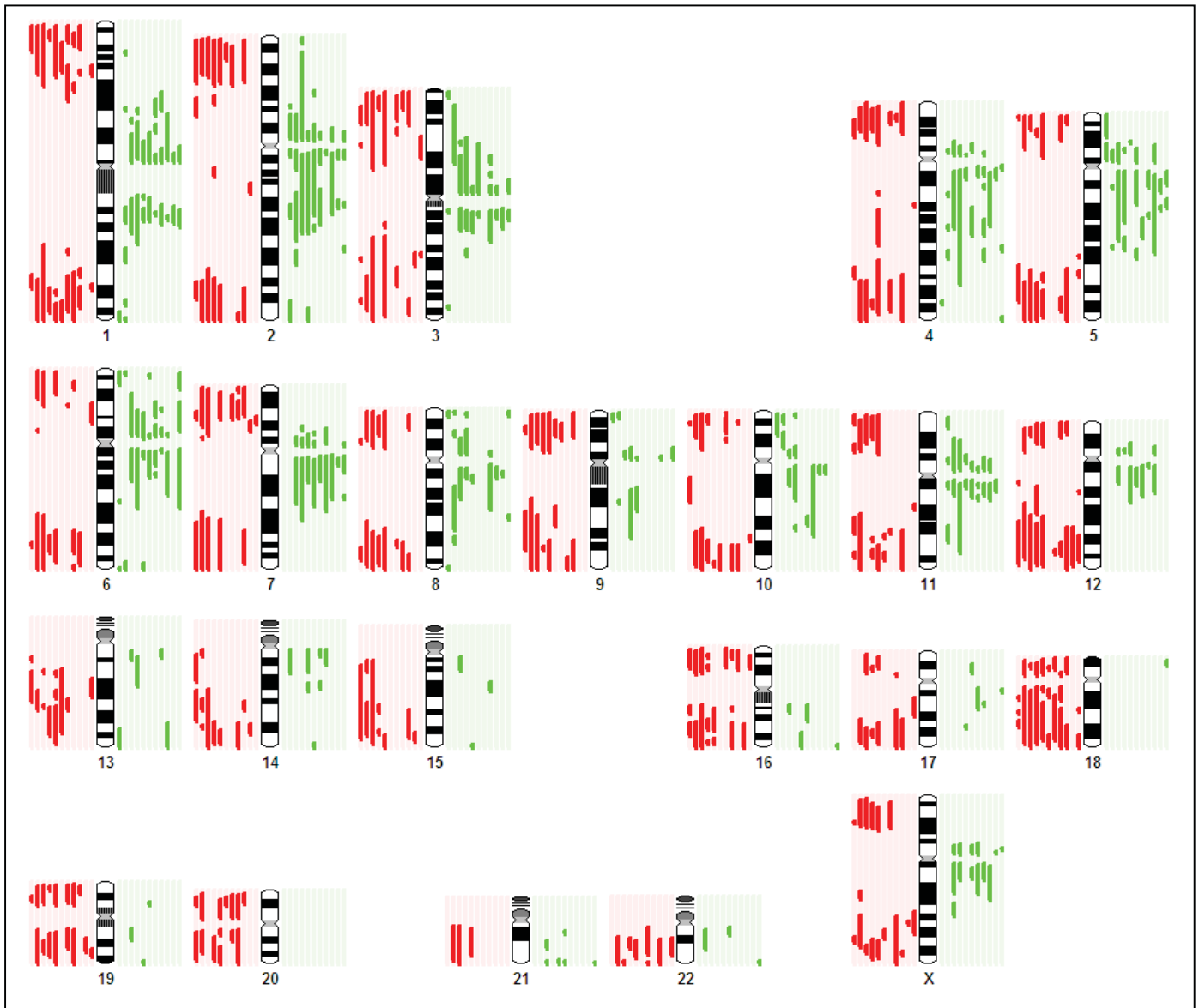


**Figura 15.** Comparação das regiões alteradas identificadas pela HR-CGH ( $P < 0,05$ ) no estroma e epitélio de quatro amostras de EDT de diferentes sítios (ovário, inter-sacro, para-tubárea e sigmóide – este último com três diferentes focos de EDT) do caso FC04-1080. As barras à esquerda indicam perda (vermelho) e à direita indicam ganho (verde). A ordem das amostras, a partir do cromossomo: FC04-1080 OE, FC04-1080 OEG, FC04-1080 IE, FC04-1080 IEG, FC04-1080 PTE, FC04-1080 PTEG, FC04-1080 RS-I E, FC04-1080 RS-I EG, FC04-1080 RS-II E, FC04-1080 RS-II EG e FC04-1080 RS-III E+EG).

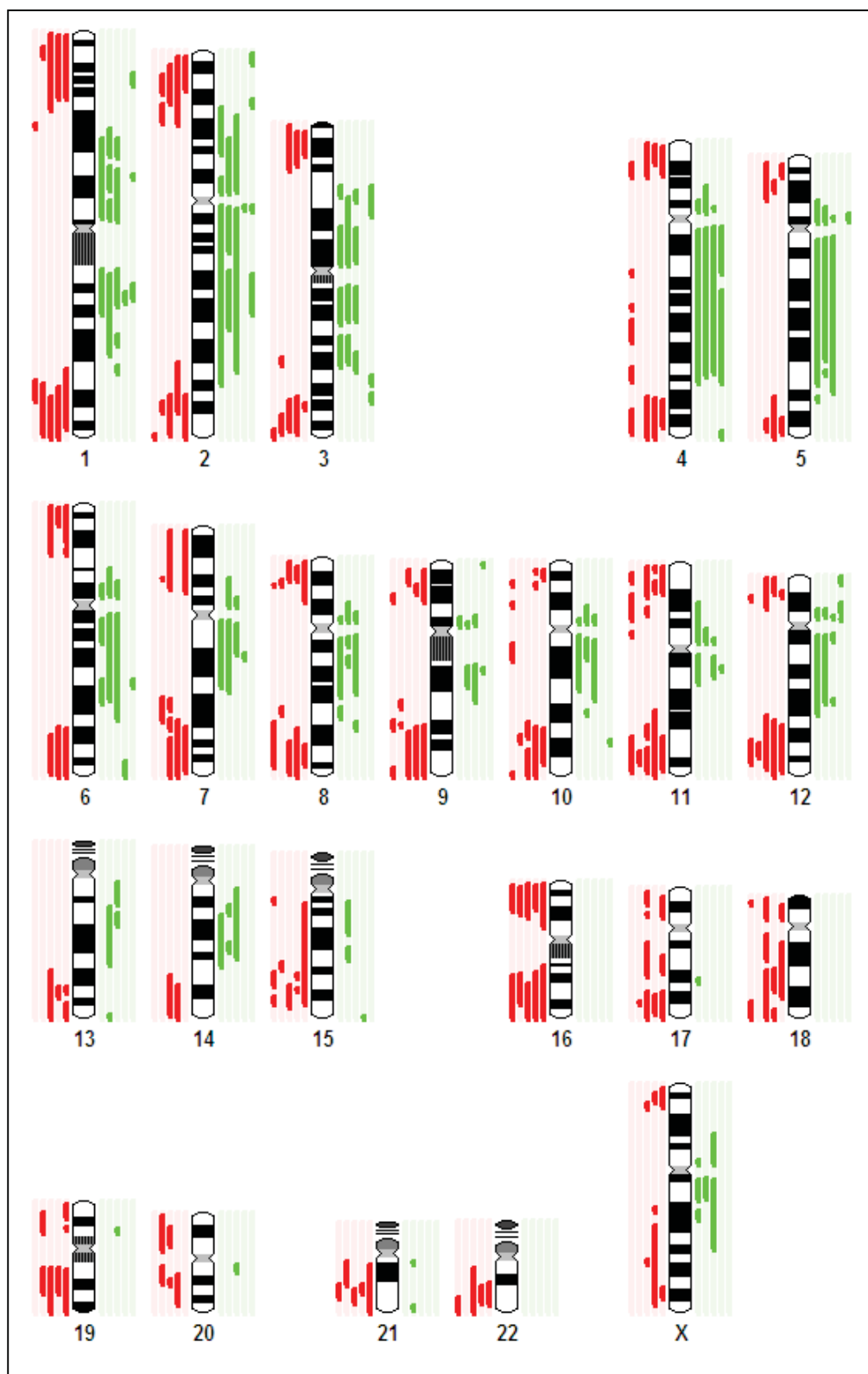


**Figura 16.** Comparação das regiões mínimas alteradas identificadas pela HR-CGH ( $P<0,05$ ) no estroma e epitélio de três amostras de EDT de diferentes sítios (retro-cervical, ligamento redondo e retossigmóide) do caso FC04-1132. As barras à esquerda indicam perda (vermelho) e à direita indicam ganho (verde). A ordem das amostras, a partir do cromossomo: FC04-1132 RCE, FC04-1132 RCEG, FC04-1132 LRE, FC04-1132 RSE e FC04-1132 RSEG.

A comparação entre as alterações presentes em EDT intestinal e de outras localizações, considerando separadamente cada componente celular, demonstrou uma elevada prevalência de regiões mínimas alteradas exclusivas no componente epitelial de lesões intestinais, incluindo ganhos no braço longo dos cromossomos 3, 4, 5 e 11, como também perdas genômicas envolvendo os cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 18, 19, 20 e 22 (Figura 17 e Tabela 5). Particularmente no estroma de EDT em intestino, a maioria das regiões alteradas foi comum àquelas observadas no componente estromal de focos endometriídeos de outros sítios (Figura 18 e Tabela 6). As poucas alterações exclusivas do estroma de lesões intestinais envolveram unicamente perdas genômicas em 1p36.1-p36.2; 1q32-q34; 2q36-q37; 3p24-p25; 3q27-q28; 9p13-p23 e 14q32. Essas regiões cromossômicas também estavam envolvidas em perdas no componente epitelial das lesões intestinais, exceto o segmento 14q32.

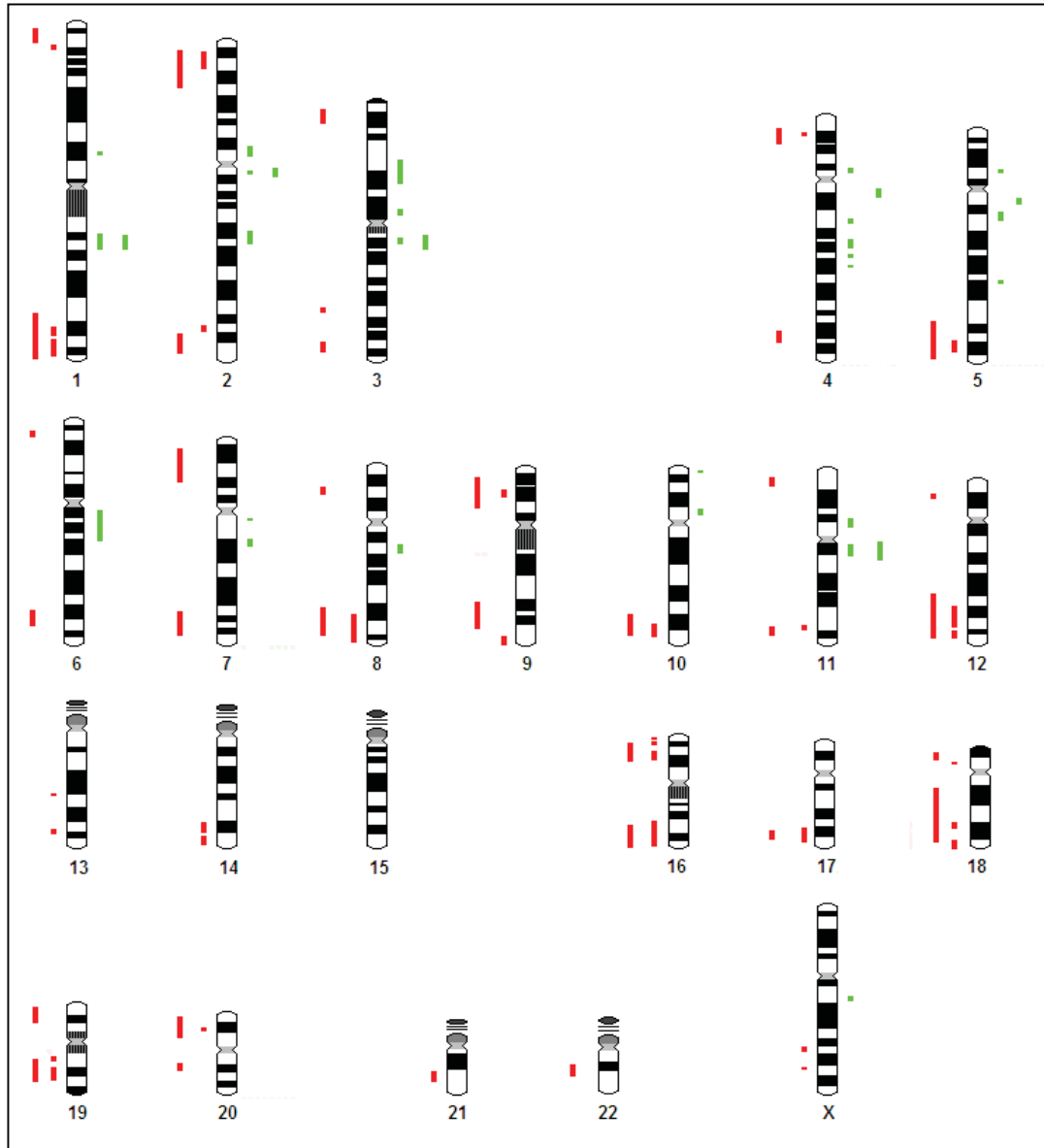


**Figura 17.** Caracterização das regiões mínimas alteradas identificadas pela HR-CGH ( $P<0,05$ ) no componente epitelial de EDT de intestino e de outros sítios. As barras à esquerda indicam perda (vermelho) e para a direita indicam ganho (verde). A ordem a partir do cromossomo: EDT de outras localizações e EDT intestinal (oito amostras).

**Tabela 5.** Regiões mínimas de perdas e ganhos genômicos detectadas no epitélio glandular de lesões endometrióides em intestino e outros sítios.

| Tipo de Alteração | Intestino                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Outras localizações                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ganhos*</b>    | 1q22-q23; 2p11.2-p12; 3q12-q13.2; 4q12-q13; 5q11.2; 11q11-q13                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 1p21; 1q21; 1q22-q23; 2p11.2-p12; 2q11.2; 2q22-q23; 3p12; 3p14-p21; 3q13.1; 4p12-p13; 4q21; 4q23-q24; 4q25; 4q26; 5p13; 5q12-q13; 5q23; 6q12-q16; 7q11.2; 7q21; 8q13; 10p11.2; 10p15; 11p11.2-p12; 11q12-q13                                                                                  |
| <b>Perdas*</b>    | 1p36.1-p36.2; 1q32-q43; 2p21-p24; 2q36-q37; 3p24-p25; 3q25; 3q27-q28; 4p15.1-p16; 4q32-q34; 5q31-q35; 6p23; 6q24-q25; 7p14-p21; 7q32-q35; 8p21; 8q23-q24.2; 9p13-p23; 9q31-q34; 10q24-q26; 11p15; 11q23-q24; 12p12; 12q21-q24.3; 13q21; 16p12-p13.2; 16q22-q24; 17q24-q25; 18p11.2-p11.3; 18q12-q23; 18q22-q23; 19p13.1-p13.3; 20p11.2-p13; 20q11.2-q12; 21q22; 22q12-q13.2; 22q12-q13 | 1p35; 1q41; 1q42; 1q43; 2p23-p24; 4p15.3; 5q34; 8q23-q24.3; 9p21; 9q34; 10q25-q26; 11q23; 12q23-q24.1; 12q24.2-q24.3; 13q22; 13q32-q33; 14q31; 14q32; 16p12-p13.1; 16p13.2; 16p13.3; 16q22-q24; 17q24-q25; 18p11.2; 18q12-q23; 18q22; 18q23; 19q13.1; 19q13.2-q13.3; 20p12; 21q22; Xq24; Xq26 |

\*Alterações presentes  $\geq 50\%$  das amostras de epitélio, total de nove amostras de intestino e sete amostras de outros sítios.

.Amostras consideradas para esta análise:

Intestino: FC01-0189 SEG, FC03-0248 RSEG, FC03-0519 SEG, FC03-1965 SEG, FC04-1080 RS-I EG, FC04-1080 RS-II EG, FC04-1132 RSEG e FC04-1181 SEG;

Outros sítios: FC01-0189 OEG, FC03-0248 BEG, FC03-1465 PEG, FC04-1080 OEG, FC04-1080 IEG, FC04-1080 PTEG e FC04-1132 RCEG.

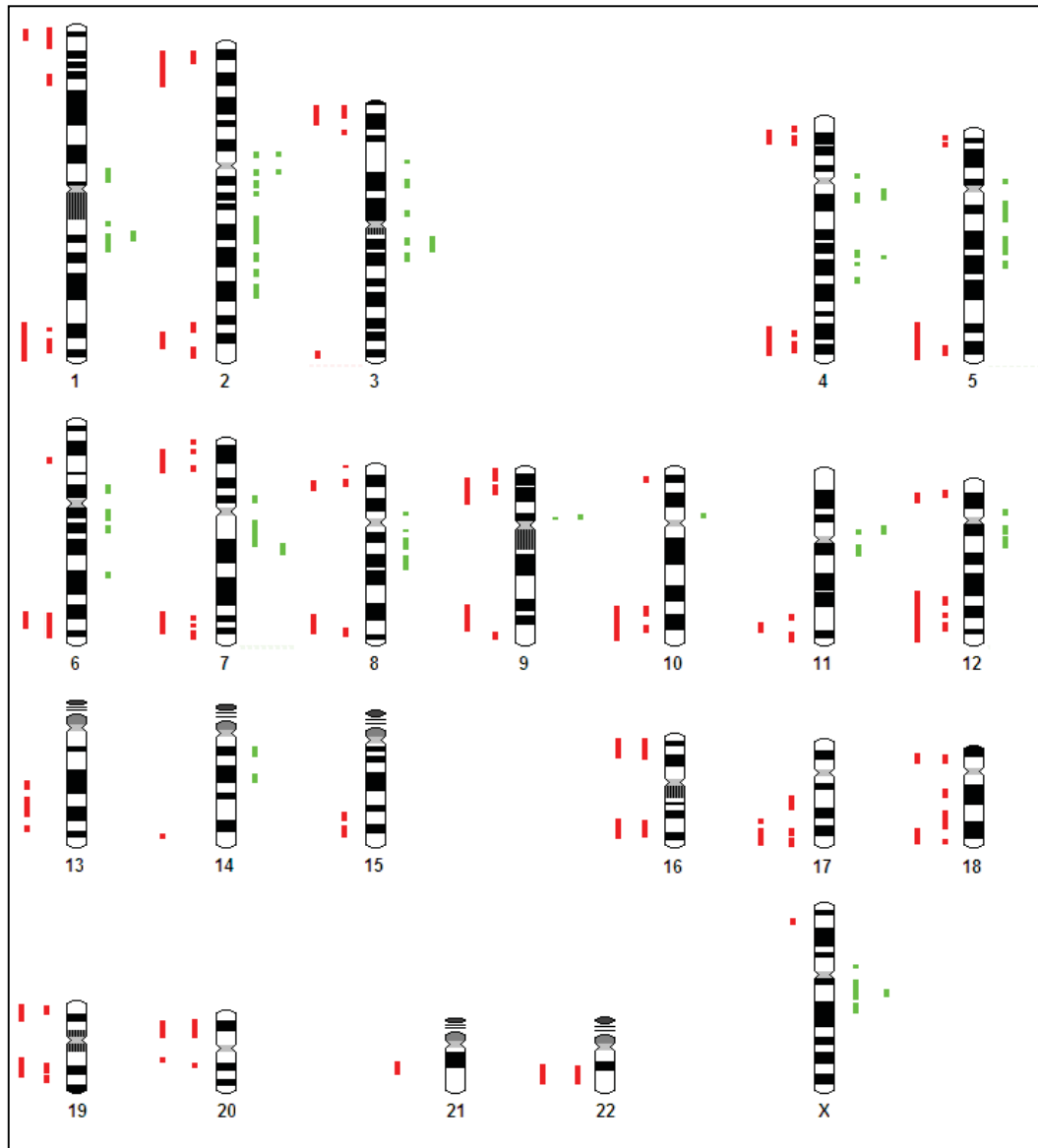


**Figura 18.** Caracterização das regiões mínimas alteradas identificadas pela HR-CGH ( $P<0,05$ ) no componente estromal de EDT de intestino e de outros sítios. As barras à esquerda indicam perda (vermelho) e à direita indicam ganho (verde). A ordem a partir do cromossomo: EDT de outras localizações e EDT intestinal (oito amostras).

**Tabela 6.** Regiões mínimas de perdas e ganhos genômicos detectados no estroma de lesões endometrióides em intestino e outros sítios.

| Tipo de Alteração |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Intestino | Outras localizações                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ganhos*           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |           | 1p13; 1q21; 1q22-q23; 2p11.2; 2q11.2; 2q12-q13; 2q13-q14.1; 2q21-q23; 2q24; 2q31; 2q32; 3p12; 3p14; 3p21; 3q12-q13.1; 3q13.3; 4p12; 4q12-q13; 4q22-q23; 4q24-q25; 4q26; 4q27; 5p12; 5q11.2-q13; 5q14-q15; 5q21; 6p12; 6q12-q13; 6q14; 6q22; 7p12; 7q11.2-q21; 8p11.2; 8q11.2; 8q12-q13; 8q21.1-q21.2; 9p12; 10p11.2; 11p11.2; 11q12-q13; 12p11.2; 12q12; 12q13; 14q12-q13; 12q12; 12q13; 14q12-q13; 14q21; Xp11.2; Xq12-q13; Xq21                                                                                                                           |
|                   | 1q22-q23; 2p11.2; 2q11.2; 3q12-q13.2; 4q12-q13; 4q25; 7q21; 9p12; 11p11.2; 11q12-q13; Xq13                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Perdas*           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |           | 1p32-p33; 1p36.1-p36.3; 1q41; 1q42-q43; 2p23-p24; 2q35-q36; 2q37; 3p23; 3p24-p25; 4p15.2-p15.3; 4p16; 4q32; 4q33-q34; 5p15.1; 5p15.2-p15.3; 5q34-q35; 6p21.3; 6q24; 6q25-q27; 7p15; 7p21-p22; 7q32; 7q33; 7q34-q36; 8p22; 8p23; 8q24.1-q24.2; 9p21-p22; 9p23; 9q34; 10p14; 10q24; 10q25-q26; 11q23-; 11q24-q25; 12p12; 12p13; 12q22; 12q23; 12q24.1-q24.2; 12q24.3; 15q24; 15q25-q26; 16p12-p13.3; 16q22-q23; 17q21-q22; 17q24; 17q25; 18p11.2-p11.3; 18q12; 18q21-q22; 18q23; 19p13.2-p13.3; 19q13.1-q13.2; 19q13.3; 20p11.2-p13; 20q12; 22q12-q13; Xp22.1 |
|                   | 1p36.1-p36.2; 1q32-q34; 2p21-p24; 2q36-q37; 3p24-p25; 3q27-q28; 4p15.1-p16; 4q32-q34; 5q31-q35; 6q24-q25; 7p14-p21; 7q32-q35; 8p21-p22; 8q23-q24.2; 9p13-p23; 9q31-q34; 10q24-q26; 11q23-q24; 12p12; 13q32; 14q32; 16p12-p13.2; 16q22-q24; 17q23; 17q24-q25; 18p11.2-p11.3; 18q22-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.3; 20p11.2-p13; 20q11.2-q12; 21q22; 22q12-q13 |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

\*Alterações presentes em ≥50% das amostras, total de oito amostras de intestino e sete amostras de outros sítios.

Amostras consideradas nesta análise:

Intestino: FC01-0189 SE, FC03-0248 RSE, FC03-0519 SE, FC03-1965 SE, FC04-1080 RS-I E, FC04-1080 RS-II E, FC04-1132 RSE e FC04-1181 SE;

Outros sítios: FC03-0519 OE, FC03-1965 VE, FC04-1080 OE, FC04-1080 IE, FC04-1080 PTE, FC04-1132 RCE e FC04-1132 LRE.

#### **4.2. Análise de expressão protéica de marcadores de célula-tronco**

A avaliação da expressão protéica de cinco marcadores de célula-tronco (CD9, CD13, CD24, CD34, CD117/c-kit, CD133 e Oct-4) foi realizada nas amostras de EDT e endométrio tópico do Grupo I avaliadas previamente pela HR-CGH. Os resultados desta análise estão apresentados na Tabela 7 e Figura 19.

As análises dos marcadores CD13, CD24 e CD133 apresentaram ausência de marcação nas amostras avaliadas. Especificamente, a expressão do CD13 foi totalmente negativa nas amostras estudadas, embora o controle tenha apresentado marcação adequada em membrana de granulócitos.

Na análise de CD9, a expressão foi positiva em células epiteliais em todas as amostras com epitélio representativo (13/13), prevalecendo marcação de membrana e de citoplasma com intensidade variando de 1 e 2, e extensão variando de 1 e 2 nas amostras estudadas (Figura 19, A e B). A expressão positiva de CD9 foi observada nas células basais das glândulas e se mostrou negativa no estroma, exceto em uma lesão vesical (FC03-1965 V), na qual foi observada marcação para CD9 em linfonodos estromais. Entretanto, mesmo nas células basais a marcação observada foi sutil. A expressão da proteína de adesão CD9 também foi positiva nas três amostras de endométrio tópico, porém em um menor número de glândulas, e quase negativa no endométrio proliferativo (o caso FC04-1132 encontrava-se na fase proliferativa do ciclo).

De maneira semelhante, a expressão positiva de CD34 foi observada em 16 amostras de EDT e nas três amostras de endométrio eutópico. Em 12 lesões que apresentaram CD34<sup>+</sup> também foi observada expressão positiva de CD9. Nas lesões endometrióides com componente epitelial representativo (12 amostras), a marcação CD34<sup>+</sup> foi detectada em células isoladas na camada basal do epitélio glandular (Figura 19, D). No estroma, marcação CD34<sup>+</sup> também foi verificada em todas as amostras com

componente estromal representativo (16/16) (Figura 19, C), em células estromais isoladas bem como em células endoteliais vasculares concentradas principalmente próximas ao foco de EDT, com intensidade de marcação variável (leve, moderada e intensa). No endométrio tópico também foram detectadas células epiteliais (3/3 casos) e estromais (2/3 casos) CD34 positivas.

As reações de imuno-histoquímica para os marcadores de célula-tronco CD117/c-Kit e Oct-4 foram realizadas apenas em oito (6 EDTs e 2 endométrios tópicos) e sete (5 EDTs e 2 endométrios tópicos) amostras (Figura 19, E e F), respectivamente, já que nas demais o material contendo a lesão foi insuficiente. Os endométrios tópicos não apresentaram expressão desses dois marcadores. Entre as lesões endometrióides avaliadas, 4/6 apresentaram marcação positiva para CD117/c-Kit, em citoplasma e membrana de células isoladas da camada basal do epitélio glandular (com intensidade moderada, e extensão variando de leve a moderada) e de raras células estromais. A expressão nuclear do Oct-4 foi detectada em 4/5 lesões em células da camada basal e apical do epitélio glandular e em células estromais, com intensidade 3 e extensão variando de 2 a 3. Em 3/4 lesões que eram Oct-4<sup>+</sup>, também mostraram marcação positiva para o CD117/c-Kit. Além disso, duas dessas três amostras apresentaram marcação positiva para CD9 e CD34 (FC03 0519 S e FC04-1181 S).

Tabela 7. Padrões de expressão das proteínas CD9, CD34, CD117/c-Kit e Oct-4 em diferentes lesões endometrióticas e endométrio tóxico.

| Casos     | Amostras     | Sítios de EDT    | CD9                                                                                                                 | CD34*                                                                            | CD117/c-Kit                                                                                        | Oct-4                                                                     |
|-----------|--------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| FC01-0189 | FC01-0189 O  | Ovário           | Material inadequado                                                                                                 | Epitélio: positivo, raras células, basais (1+3)<br>Estroma: positivo leve (1)    | Epitélio: negativo<br>Estroma: negativo                                                            | Epitélio: células basais e apicais, núcleo (3+2)<br>Estroma: núcleo (2+1) |
|           | FC01-0189 S  | Sigmóide         | Epitélio: células da camada basal, membrana e citoplasma (1+2)<br>Estroma: negativo.                                | Epitélio: positivo, raras células, basais (1+3)<br>Estroma: positivo intenso (3) | -                                                                                                  | Epitélio: células basais e apicais, núcleo (3+3)<br>Estroma: núcleo (2+3) |
| FC03-1965 | FC03-1965 V  | Vesical (Bexiga) | Epitélio: células da camada basal, membrana e citoplasma (1+3)<br>Estroma: 2 linfonodos estromais marcados (1+1).   | Epitélio: positivo, raras células, basais (1+1)<br>Estroma: positivo leve (1)    | -                                                                                                  | -                                                                         |
|           | FC03-1965 S  | Sigmóide         | Epitélio: células da camada basal, membrana e citoplasma (2+1)<br>Estroma: negativo                                 | Epitélio: células basais raras (1+2)<br>Estroma: positivo intenso (3)            | Epitélio: células basais isoladas, membrana e citoplasma (2+2)<br>Estroma: negativo                | -                                                                         |
| FC03-0248 | FC03-0248 R  | Reto             | Epitélio: material inadequado<br>Estroma: negativo (Somente componente estromal na amostra)                         | Epitélio: material inadequado<br>Estroma: positivo moderado (2)                  | Epitélio: negativo<br>Estroma: negativo                                                            | Epitélio: negativo<br>Estroma: raras células positivas                    |
|           | FC03-0248 RC | Retro-cervical   | Epitélio: células da camada basal, membrana e citoplasma (1+1)<br>Estroma: negativo (Predomina componente estromal) | Epitélio: células basais raras (1+2)<br>Estroma: positivo intenso (3)            | -                                                                                                  | -                                                                         |
|           | FC03-0248 RS | Retosigmóide     | Epitélio: material inadequado<br>Estroma: negativo                                                                  | Epitélio: células basais raras (1+3)<br>Estroma: positivo leve (1)               | Epitélio: negativo<br>Estroma: raras células positivas                                             | Epitélio: células basais e apicais, núcleo (3+2)<br>Estroma: núcleo (2+1) |
| FC03-0519 | FC03-0519 S  | Sigmóide         | Epitélio: células da camada basal, membrana e citoplasma (1+2)<br>Estroma: negativo                                 | Epitélio: células basais raras (1+3)<br>Estroma: positivo intenso (3)            | Epitélio: células basais isoladas, membrana e citoplasma (2+2)<br>Estroma: raras células positivas | -                                                                         |
|           | FC03-0519 O  | Ovário           | Material inadequado                                                                                                 | Material inadequado                                                              | -                                                                                                  | -                                                                         |
| FC03-1465 | FC03-1465 P  | Peritônio        | Material inadequado                                                                                                 | Material inadequado                                                              | -                                                                                                  | -                                                                         |

Tabela 7. Continuação.

| Casos     | Amostras         | Sítios de EDT             | CD9                                                                                 | CD34*                                                            | CD117/c-Kit                                                                                        | Oct-4                                                                     |
|-----------|------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| FC04-1080 | FC04-1080 IS     | Inter-sacro               | Epitélio: células da camada basal, membrana e citoplasma (1+1)<br>Estroma: negativo | Epitélio: basais raras (3+2)<br>Estroma: positivo intenso (3)    | -                                                                                                  | -                                                                         |
|           | FC04-1080 PT     | Para-tubárea              | Epitélio: células da camada basal, membrana e citoplasma (2+2)<br>Estroma: negativo | Epitélio: material inadequado<br>Estroma: positivo moderado (2)  | -                                                                                                  | -                                                                         |
|           | FC04-1080 O      | Ovário                    | Epitélio: células da camada basal, membrana e citoplasma (2+1)<br>Estroma: negativo | Material inadequado                                              | -                                                                                                  | -                                                                         |
|           | FC04-1080 RS-I   | Retossigmóide – lesão I   | Epitélio: células da camada basal, membrana e citoplasma (1+1)<br>Estroma: negativo | Epitélio: material inadequado<br>Estroma: positivo intenso (3)   | -                                                                                                  | -                                                                         |
|           | FC04-1080 RS-II  | Retossigmóide – lesão II  | Material inadequado                                                                 | Epitélio: células basais (3+1)<br>Estroma: positivo moderado (2) | -                                                                                                  | -                                                                         |
|           | FC04-1080 RS-III | Retossigmóide – lesão III | Epitélio: células da camada basal, membrana e citoplasma (1+2)<br>Estroma: negativo | Epitélio: células basais (3+2)<br>Estroma: positivo intenso (3)  | -                                                                                                  | -                                                                         |
|           | FC04-1080 EU     | Endométrio típico         | Epitélio: células da camada basal, membrana e citoplasma (2+2)<br>Estroma: negativo | Epitélio: células basais (3+2)<br>Estroma: positivo moderado (2) | -                                                                                                  | -                                                                         |
|           | FC04-1181 S      | Sigmóide                  | Epitélio: células da camada basal, membrana e citoplasma (2+1)<br>Estroma: negativo | Epitélio: células basais (2+1)<br>Estroma: positivo leve (1)     | Epitélio: células basais isoladas, membrana e citoplasma (2+1)<br>Estroma: raras células positivas | Epitélio: células basais e apicais, núcleo (3+3)<br>Estroma: núcleo (2+3) |
|           | FC04-1181 EU     | Endométrio típico         | Epitélio: células da camada basal, membrana e citoplasma (1+2)<br>Estroma: negativo | Epitélio: células basais (3+3)<br>Estroma: positivo intenso (3)  | Epitélio: negativo<br>Estroma: negativo                                                            | Epitélio: negativo<br>Estroma: negativo                                   |

Tabela 7. Continuação.

| Casos     | Amostras     | Sítios de EDT     | CD9                                                                                 | CD34*                                                                  | CD117/c-Kit                             | Oct-4                                   |
|-----------|--------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| FC04-1132 | FC04-1132 RC | Retro-cervical    | Epitélio: células da camada basal, membrana e citoplasma (1+1)<br>Estroma: negativo | Epitélio: material inadequado<br>Estroma: positivo leve (1)            | -                                       | -                                       |
|           | FC04-1132 LR | Ligamento Redondo | Epitélio: material inadequado<br>Estroma negativo                                   | Material inadequado                                                    | -                                       | -                                       |
|           | FC04-1132 RS | Retossigmóide     | Epitélio: células da camada basal, membrana e citoplasma (1+2)<br>Estroma: negativo | Epitélio: células basais raras (1+3)<br>Estroma: positivo moderado (3) | -                                       | -                                       |
|           | FC04-1132 EU | Endométrio típico | Epitélio: células da camada basal, membrana e citoplasma (1+1)<br>Estroma: negativo | Epitélio: células basais (3+3)<br>Estroma: positivo leve (1)           | Epitélio: negativo<br>Estroma: negativo | Epitélio: negativo<br>Estroma: negativo |

Entre parênteses na tabela (intensidade+extensão); \*Para CD34, em estroma foi avaliada intensidade demonstrada entre parênteses.

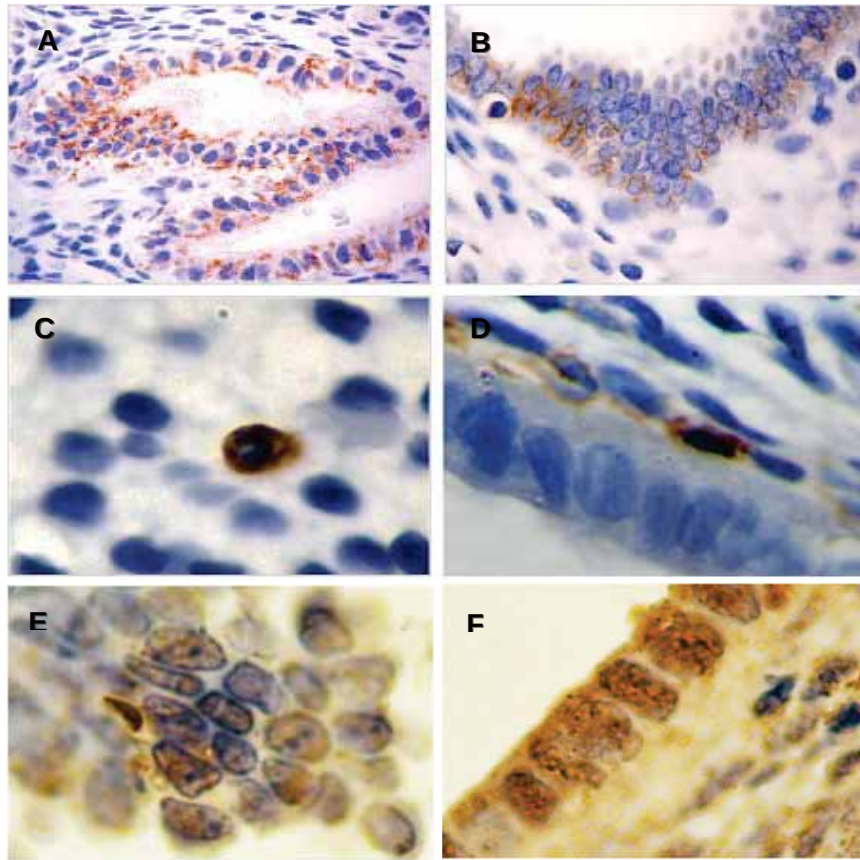


**Figura 19.** Padrões de expressão dos marcadores CD9, CD34, CD117/c-kit e Oct-4 observada em células endometriais do epitélio glandular e/ou do estroma, com intensidade (I) e extensão (E) variável entre as amostras. A imunoexpressão em membrana e citoplasma da proteína CD9 foi detectada predominantemente em células basais do epitélio glandular, em **(A)** I 2, E 3 (1000x - IMH) em **(B)** I 2, E 2 (1000x - IMH). Células isoladas CD34<sup>+</sup> foram observadas no estroma **(C)** (1000x - IMH) e na camada basal do epitélio glandular **(D)** (1000x - IMH). **(E)** Expressão nuclear do Oct-4 em células estromais, I 2, E 3 (1000x - IMH). **(F)** Expressão nuclear e citoplasmática do CD117/c-kit na camada epitelial, I 2, E 2 (1000x - IMH).

#### **4.3. Análise de alterações genômicas pela aCGH - Grupo II**

##### **Caracterização geral das alterações**

No total foram detectadas 585 CNVs com média de  $32,5 \pm 22,9$ . As lesões avaliadas apresentaram alterações genômicas que variaram de 10 a 94 por caso, as quais foram divididas em ganhos (1 cópia adicional), perdas (1 cópia ausente) e alto nível de ganhos (2 ou mais cópias adicionais). Foram observados 316 ganhos (54%), 249 perdas (42,6%) e 20 ganhos em alto nível (3,4%); não foram detectadas perdas homozigotas (2 cópias ausentes) (Figura 20, B). Os ganhos genômicos (ganhos + alto nível de ganhos) envolveram principalmente os cromossomos 1, 2 e 16 (23, 25 e 23 eventos, respectivamente), enquanto perdas cromossômicas ocorreram principalmente para o cromossomo 1 (26 eventos). O menor número de variações genômicas foi encontrado para o cromossomo 20, o qual apresentou somente seis perdas genômicas e dois ganhos cromossômicos (Figura 20, A).

A avaliação dos resultados quanto ao tamanho das alterações revelou ganhos genômicos envolvendo regiões de 65-22.758Kb (média de 3.269Kb e mediana de 1.696Kb) enquanto perdas variaram de 104-14.640Kb (média de 2.187Kb e mediana de 1.248Kb). Foi observada diferença significativa entre as médias dos tamanhos de ganhos e perdas genômicas (teste de *Mann-Whitney*;  $P=0,0058$ ). Os dados de dispersão para a extensão das alterações estão representados na Figura 20, C.

##### **Variações mais frequentes no grupo estudado**

O ideograma final para todos os casos analisados está representado na Figura 21. Várias regiões cromossômicas apresentaram alta frequência de CNVs (Figura 21, A). As

alterações detectadas em mais de 20% dos casos estudados foram selecionadas e comparadas ao banco de dados genômicos de 82 mulheres brasileiras saudáveis. Nenhuma dessas regiões estava presente em mais de 5% das mulheres normais e, portanto, não foram excluídas da análise (McCarroll et al., 2008); essas CNVs foram selecionadas para um estudo mais detalhado (Figura 21, B, Tabela 8).

As alterações selecionadas presentes em >20% dos casos (variando entre 22 a 33%) compreenderam 8 ganhos e 5 perdas genômicas. Os ganhos estavam presentes em 3p, 5q, 6q e 22q (4/18 casos), 10q, 13q, 14q e 17p (5/18 casos). Essas alterações variaram de 124 a 4.226Kb e envolveram um total de 136 genes e 1 miRNA. A frequência de CNVs já descritas nas regiões de ganhos variou de 0 a 75% (banco de dados DGV, do inglês *Database of Genomic Variants*). As perdas foram mais frequentes em 10q e 20q (4/18 casos), 11q e 17q (5/18 casos), e 22q (6/18 casos). As perdas variaram de 623 a 1.529Kb e englobaram regiões contendo um total de 85 genes e nenhum miRNA. A frequência de CNVs já descritas para as regiões de perda variou de 6 a 58%. As alterações em detalhes estão apresentadas no Anexo 2.

A maioria das variações estruturais (ganhos e perdas genômicas) verificada em mais de 20% dos casos envolveu pequenas regiões cromossômicas contendo poucos genes (<20 genes). Particularmente, duas regiões que apresentaram variações no número de cópias (perda em 17q12 e ganho em 13q21.31-q21.32) apresentaram a alteração de genes únicos. A perda em 17q12 envolveu o gene *PCDH9*, com cobertura de CNVs descritas previamente de 6,4%. O ganho observado em 13q21.31-q21.32 (com cobertura de CNVs descritas de 75,4%) envolveu o gene *CDH4*. Outras regiões pequenas envolvidas em ganhos genômicos também foram detectadas em 3p14.3, 6q16.3-q21, 10q22.3 e 14q24.1-q24.2 respectivamente para os genes *CACNA2D3*, *HESRG*, *LRTM1*, *WNT5A*, *C3orf51* e *ERC2*; *ASCC3*, *GRIK2* e *HACE1*; *C10orf11* e

*KCNMA1*; *LOC100289511*, *SFRS5* e *SLC10A1* (com cobertura de CNVs descritas no DGV de 22,1%, 35%, 9,3% e 0, respectivamente).

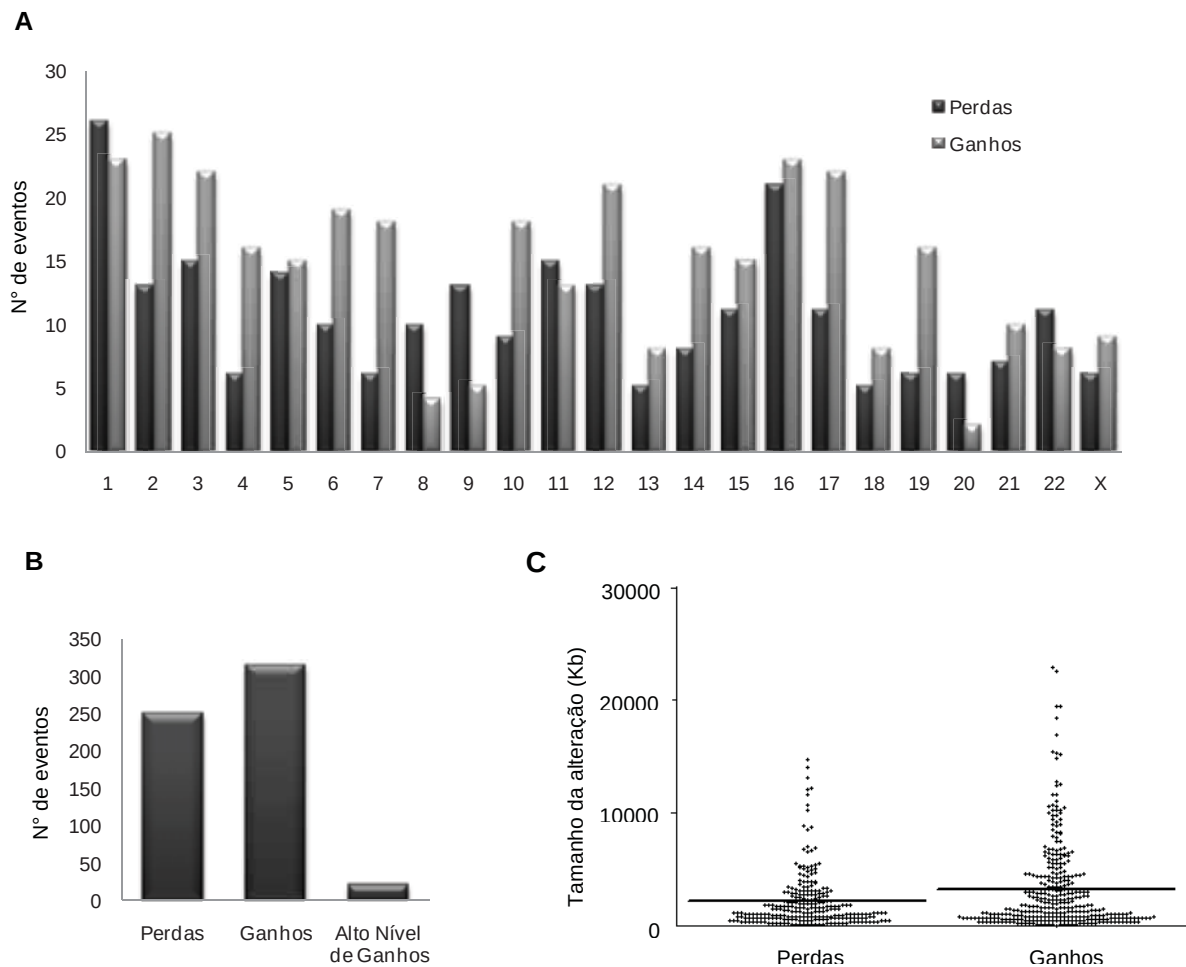


**Figura 20.** Representação gráfica do número de alterações em todo o genoma (B) e por cromossomo (A) encontrados nas 18 lesões de EDT intestinal profunda avaliadas pela metodologia de aCGH. Em (B) observa-se a prevalência de ganhos genômicos e em (A) observa-se maior número de ganhos para os cromossomos 1, 2 e 16 e maior quantidade de perdas para o cromossomo 1. Dados de dispersão baseados no tamanho dos ganhos e perdas genômicas (C). A diferença entre o tamanho dos ganhos, assim como das perdas, foi significativa ( $P=0,0058$ ). Imagens obtidas no programa *GraphpadPrism 5*.

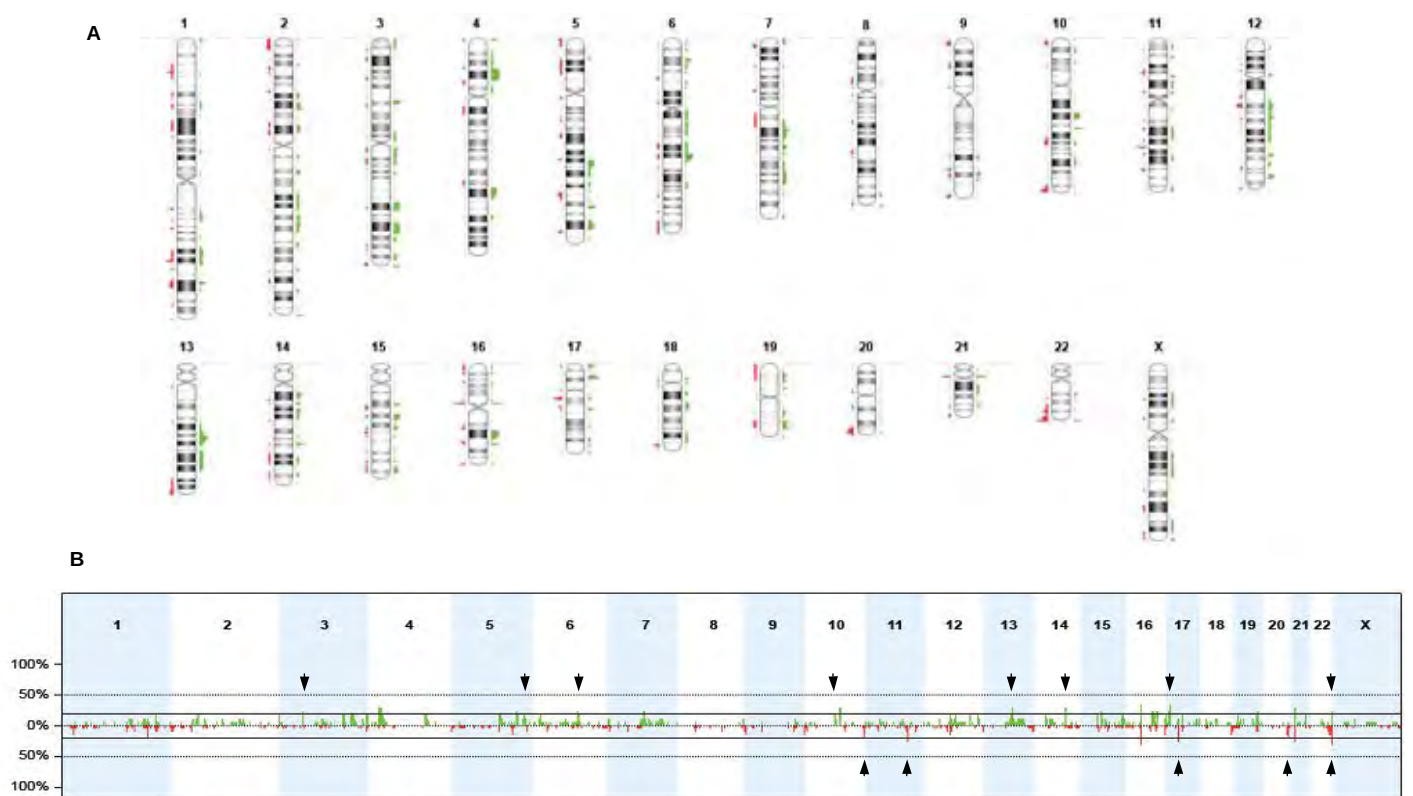


**Figura 21.** Ideograma ilustrando as alterações genômicas encontradas nas 18 lesões de EDT intestinal avaliadas pela técnica de aCGH (A). As barras à direita do eixo central de cada cromossomo representam ganhos, enquanto as barras à esquerda indicam perdas genômicas. Representação das frequências de alterações em todo o conjunto cromossômico (Cromossomos 1 ao X) (B). As barras superiores (verdes) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas. As marcações (\*) indicam alterações presentes em mais de 20% dos casos. Imagens geradas pelo programa *Nexus version 5.0*.

Tabela 8. Alterações genômicas encontradas em mais de 20% das 18 amostras de EDT intestinal avaliadas.

| Região               | Start       | Stop        | Tamanho (Kb) | Evento | N° Genes | miRNAs | Frequência (%) | CNVs (%)* | Casos                   | Genes                                                                                                                      |
|----------------------|-------------|-------------|--------------|--------|----------|--------|----------------|-----------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Cromossomo 3</b>  |             |             |              |        |          |        |                |           |                         |                                                                                                                            |
| p14.3                | 54,639,489  | 55,666,753  | 1.027        | Ganho  | 6        | 0      | 22,2           | 22,1      | 18, 169, 242, 264       | CACNA2D3, HESRG, LRTM1, WNT5A, C3orf51, ERC2                                                                               |
| <b>Cromossomo 5</b>  |             |             |              |        |          |        |                |           |                         |                                                                                                                            |
| q32 - q33.1          | 146,368,511 | 148,007,493 | 1.639        | Ganho  | 15       | 0      | 22,2           | 15,8      | 18, 116, 157, 256       | PPP2R2B, STK32A, DPYSL3, JAKMIP2, SPINK1, SCGB3A2, C5orf46, SPINK5, SPINK14, SPINK6, SPINK13, SPINK7, SPINK9, FBXO38, HTR4 |
| <b>Cromossomo 6</b>  |             |             |              |        |          |        |                |           |                         |                                                                                                                            |
| q16.3 - q21          | 101,110,187 | 105,335,828 | 4.226        | Ganho  | 3        | 0      | 22,2           | 35        | 83, 157, 264, 302       | ASCC3, GRIK2, HACE1                                                                                                        |
| <b>Cromossomo 10</b> |             |             |              |        |          |        |                |           |                         |                                                                                                                            |
| q22.3                | 77,765,079  | 78,456,791  | 692          | Ganho  | 2        | 0      | 27,7           | 9,3       | 83, 218, 242, 243, 302  | C10orf11, KCNMA1                                                                                                           |
| q26.3                | 132,676,975 | 134,206,047 | 1.529        | Perda  | 10       | 0      | 22,2           | 41,9      | 157, 190, 207, 214,     | TCERG1L, PPP2R2D, BNIP3, JAKMIP3, DPYSL4, STK32C, LRRC27, PWWP2B, C10orf91, INPP5A                                         |
| <b>Cromossomo 11</b> |             |             |              |        |          |        |                |           |                         |                                                                                                                            |
| q21                  | 93,879,810  | 94,578,828  | 699          | Perda  | 9        | 0      | 22,2           | 8,9       | 185, 190, 207, 214, 255 | FUT4, PIWIL4, AMOTL1, CWC15, KDM4D, KDM4DL, SFRS2B, ENDOD1, SESN3                                                          |
| <b>Cromossomo 13</b> |             |             |              |        |          |        |                |           |                         |                                                                                                                            |
| q21.31 - q21.32      | 63,322,957  | 65,823,692  | 2.501        | Ganho  | 1        | 0      | 22,2           | 75,4      | 116, 157, 207, 256, 302 | PCDH9                                                                                                                      |
| <b>Cromossomo 14</b> |             |             |              |        |          |        |                |           |                         |                                                                                                                            |
| q24.1 - q24.2        | 69,267,601  | 69,391,382  | 124          | Ganho  | 3        | 0      | 27,7           | 0         | 116, 157, 214, 255, 256 | LOC100289511, SFRS5, SLC10A1                                                                                               |

Tabela 8. Continuação.

| Região        | Start      | Stop       | Tamanho (Kb) | Evento | Nº Genes | miRNAs | Frequência (%) | CNVs (%) | Casos                       | Genes                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------|------------|------------|--------------|--------|----------|--------|----------------|----------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cromossomo 17 |            |            |              |        |          |        |                |          |                             |                                                                                                                                                                                                                                                                |
| p12- p13.1    | 9,618,350  | 12,444,195 | 2.826        | Ganho  | 19       | 1      | 27,7           | 16,5     | 83, 218, 242, 243, 264      | DHRS7C, GLP2R, RCVRN, GAS7, MYH13, MYH8, MYH4, MYH1, MYH2, MYH3, SCO1, C17orf48, TMEM220, PIRT, SHISA6, DNAH9, ZNF18, MIR744, MAP2K4                                                                                                                           |
| q12           | 28,986,700 | 30,059,953 | 1.073        | Perda  | 9        | 0      | 22,2           | 6,4      | 185,190, 207, 214, 255      | ACCN1, CCL2, CCL7, CCL11, CCL8, CCL13, CCL1, C17orf102, TMEM132E                                                                                                                                                                                               |
| Cromossomo 20 |            |            |              |        |          |        |                |          |                             |                                                                                                                                                                                                                                                                |
| q13.33        | 59,332,942 | 59,956,016 | 623          | Perda  | 1        | 0      | 22,2           | 33,4     | 190, 207, 214, 243          | CDH4                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Cromossomo 22 |            |            |              |        |          |        |                |          |                             |                                                                                                                                                                                                                                                                |
| q13.33        | 48,821,440 | 49,691,432 | 870          | Perda  | 33       | 0      | 33,3           | 58,3     | 83, 157, 242, 243, 264, 302 | TTLL8, MLC1, MOV10L1, PANX2, TRABD, SELO, TUBGCP6, HDAC10, MAPK12, MAPK11, PLXNB2, FAM116B, SAPS2, SBF1, ADM2, MIOX, LMF2, NCAPH2, SCO2, TYMP, ODF3B, KLHDC7B, C22orf41, CPT1B, CHKB-CPT1B, CHKB, LOC100144603, MAPK8IP2, ARSA, SHANK3, ACR, RABL2B, RPL23AP82 |
| q13.33        | 49,041,686 | 49,691,432 | 650          | Ganho  | 25       | 0      | 22,2           | 49,2     | 116, 157, 214, 255          | MAPK12, MAPK11, PLXNB2, FAM116B, SAPS2, SBF1, ADM2, MIOX, LMF2, NCAPH2, SCO2, TYMP, ODF3B, KLHDC7B, C22orf41, CPT1B, CHKB-CPT1B, CHKB, LOC100144603, MAPK8IP2, ARSA, SHANK3, ACR, RABL2B, RPL23AP82                                                            |

\*Baseado no Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>).

A análise de agrupamentos hierárquicos não supervisionados dos perfis de alterações genômicas encontrado nos 18 casos de EDT intestinal avaliados determinou a separação de dois grupos: *clusters* 1 (7 casos) e 2 (11 casos) (Figura 22, A). Considerando as alterações genômicas significativas (*P-value threshold* 0,05) presentes em mais de 20% dos casos de cada grupo, foi verificado um maior número de alterações no *cluster* 1 (23 CNVs) em relação ao *cluster* 2 (4 CNVs) (Figura 22, B). Esse agrupamento teve associação estatisticamente significativa com a alteração estrutural presente em 22q13.33 ( $P=0,008$ ; *start*: 49.041.686 a *end*: 49.691.432). Interessantemente, a alteração nesta região está presente em mais de 20% dos 18 casos e foi associada a ganhos nos casos do *cluster* 1 e perda nos casos no *cluster* 2 (Figura 22, B; Anexo 2, L). Nenhuma associação estatisticamente significativa foi detectada entre os agrupamentos e características clínicas e histopatológicas.

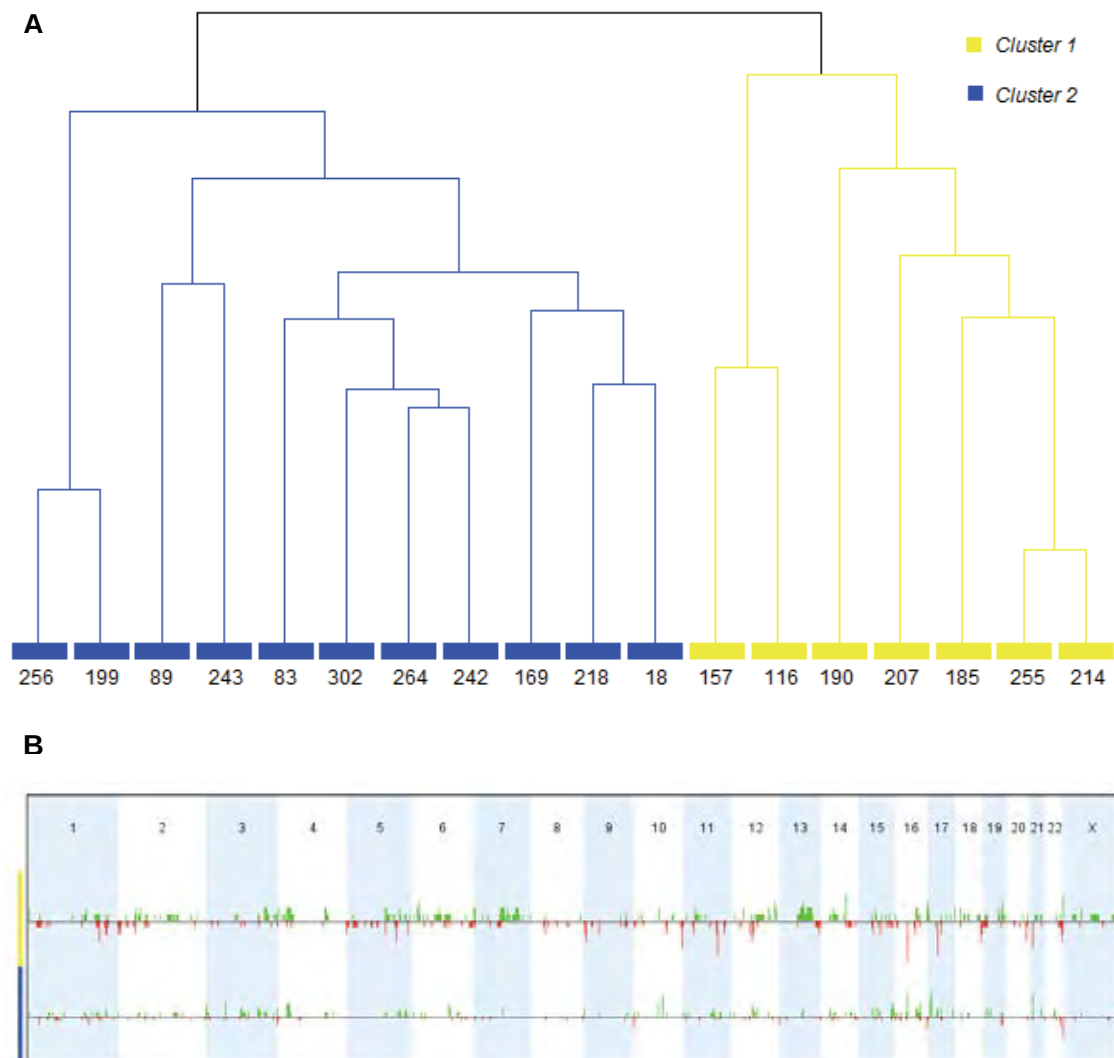


**Figura 22.** Agrupamento hierárquico não supervisionado realizado para 18 lesões de EDT intestinal baseado no perfil de alterações genômicas encontrado em cada caso. (A) A análise dividiu os casos em 2 grupos denominados *cluster 1* (amarelo) e *cluster 2* (azul). (B) O perfil genômico de cada *cluster* revelou que o *cluster 1* apresenta maior número de alterações genômicas em relação ao *cluster 2*. A seta destaca a região em 22q13.33, em que os ganhos foram significativamente associados aos *cluster 1* e as perdas ao *cluster 2*. Verde: ganhos; vermelho: perdas genômicas.

### **Caracterização dos genes envolvidos nas regiões genômicas alteradas**

Os genes envolvidos nas regiões de perdas e ganhos foram submetidos à análise de redes, vias gênicas, doenças relacionadas e função celular ou molecular com a utilização do software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (*Ingenuity Systems*). Os scores para cada item foram calculados pelo teste exato de *Fischer* e são iguais a  $-\log$  (valor de *P*).

As principais doenças e funções celulares ou moleculares relacionadas aos genes envolvidos em ganhos e perdas genômicas estão representadas na Figura 23 (maiores scores, valores entre 9,34 e 3,18 para doenças e 4,75 a 3,18 para funções). A avaliação dos resultados mostrou um grande número de moléculas alteradas que estão associadas a doenças gastrointestinais, genéticas e inflamatórias, bem como a predominância de genes com função em desenvolvimento, morfologia movimento e sobrevivência celular, bem como sinalização celular. A alteração de tais processos biológicos também foi verificada nas lesões de ambos os *clusters* após a análise das funções biológicas dos genes alterados em cada grupo. Essa análise demonstrou o envolvimento de diferentes processos celulares entre os dois agrupamentos, com prevalência de funções celulares alteradas exclusivamente no *cluster 1* incluindo apresentação de antígeno, ciclo celular, função celular, metabolismo de drogas e energia, como também regulação pós-transcricional e pós-traducional.

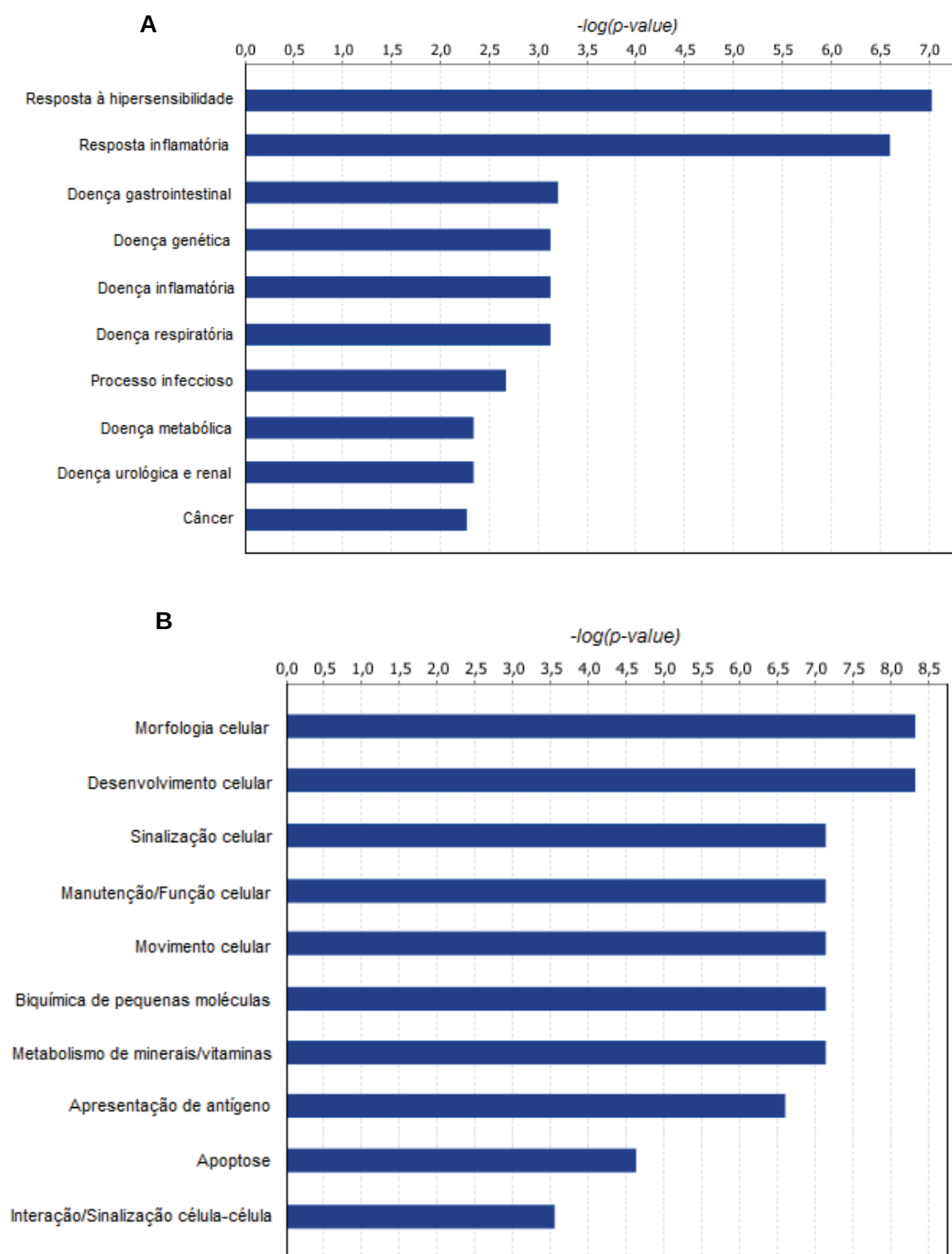


**Figura 23.** Genes diferencialmente expressos entre as 18 amostras de EDT intestinal avaliadas e associados às doenças (A) e funções celulares e moleculares (B) que apresentaram os maiores scores (em azul escuro). Cada parâmetro também foi comparado com os genes descritos na literatura e associados à EDT (em azul claro). Os scores são calculados pelo teste exato de *Fischer* e são iguais a  $-\log(\text{valor de } P)$ . Imagens geradas pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA).

Os genes alterados também se correlacionaram com importantes vias canônicas previamente descritas. As vias com maiores scores (6,43 a 1,09) estão representadas na Figura 24. As vias mais relevantes, ou seja, com scores significativos e maior número de genes alterados envolvido, incluíram a via de sinalização de ILK (do inglês, *Integrated-linked Kinase*) (9 genes alterados), seguida por genes associados a sinalização do quimiocinas (6 genes alterados) e sinalização de interleucina 17 (5 genes alterados) (Tabela 9). As representações esquemáticas dessas três vias, incluindo os genes alterados, estão apresentadas na Figuras 25.

Nesta análise, também foram encontradas oito redes contendo os genes alterados deste estudo, sendo que as duas redes com maiores scores (27 e 9, respectivamente) estão representadas na Figura 26. Os genes envolvidos em ganhos e perdas genômicas em cada uma das vias estão descritos na Tabela 10. A principal rede gênica possui 15 genes alterados e está relacionada a processos de motilidade celular, função e desenvolvimento do sistema hematológico, e tráfego de células do sistema imunológico (Figura 29, A). A segunda rede gênica apresentou 9 genes alterados e está relacionada ao desenvolvimento, crescimento e proliferação celular (Figura 29, B). Pode-se notar que essas duas redes apresentam alterações principalmente em genes periféricos.

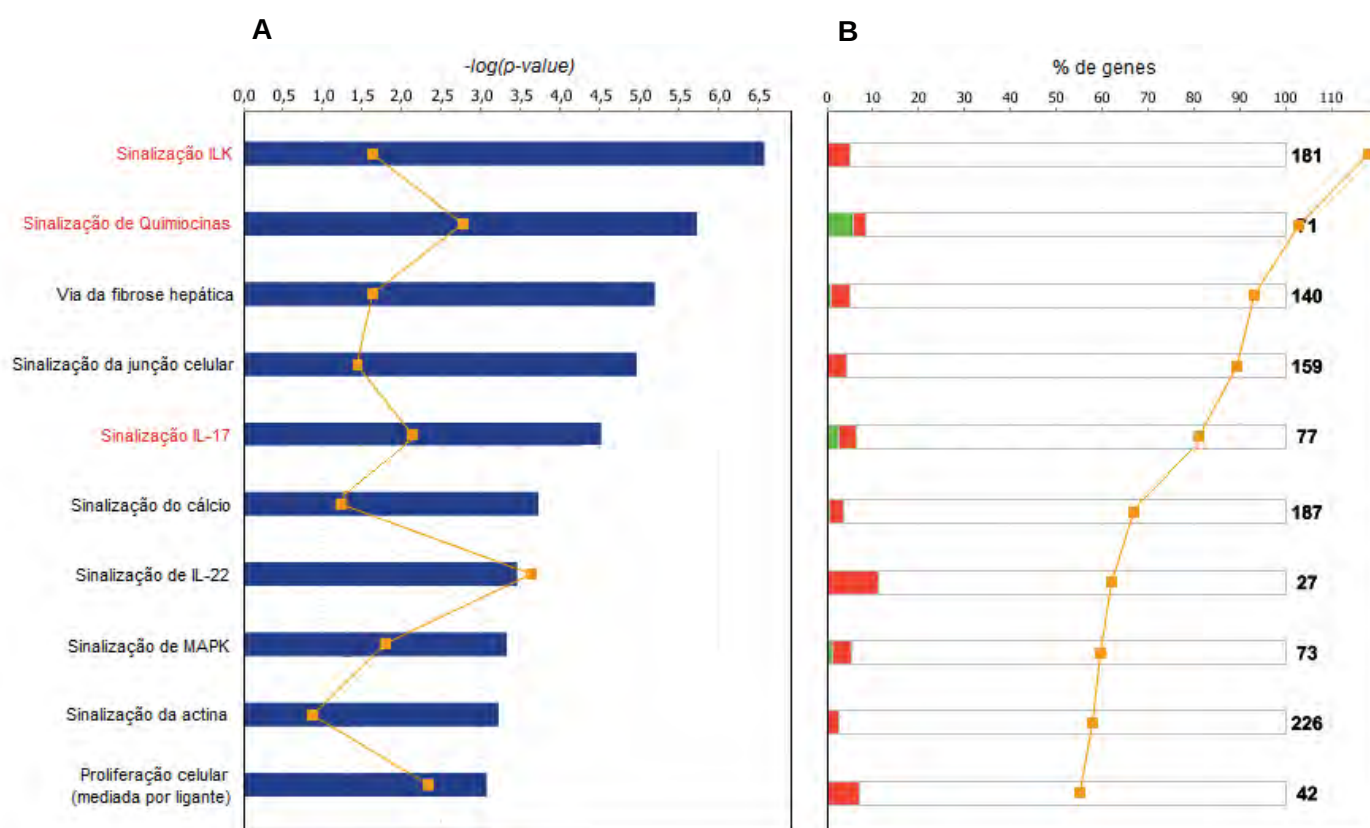


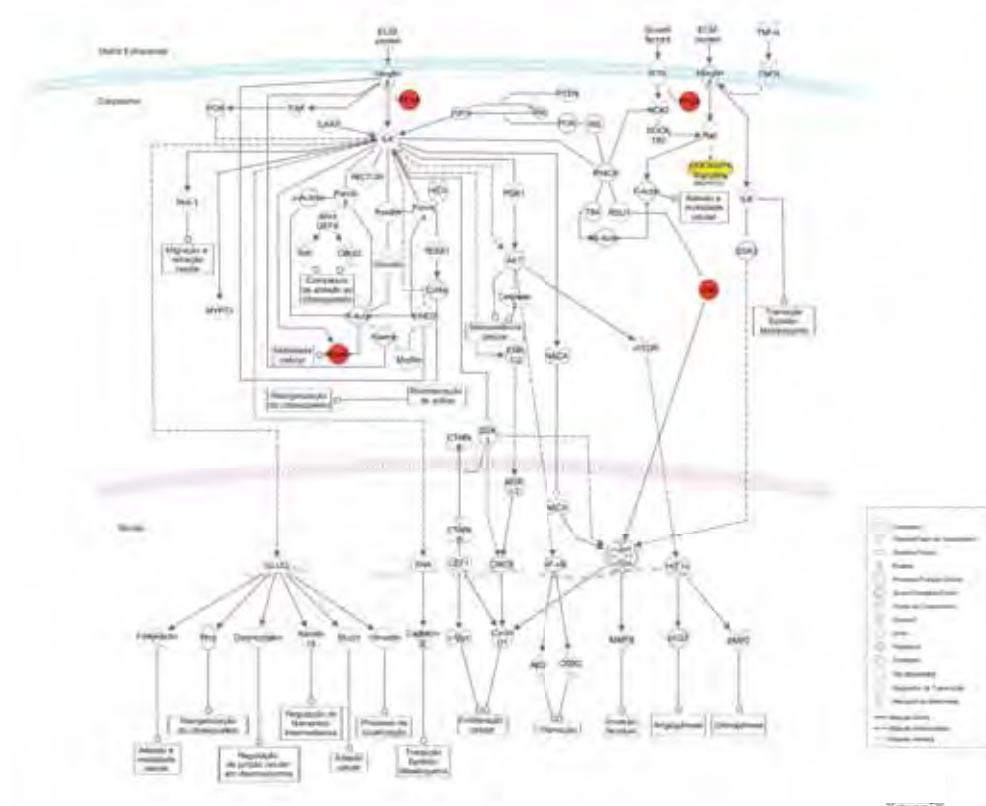
**Figura 24.** (A) Vias canônicas correlacionando com os genes envolvidos em perdas e ganhos presentes em > 20% das lesões de EDT intestinal e que apresentaram os maiores scores. Em vermelho, estão destacadas as vias canônicas mais relevantes. (B) Porcentagem de genes envolvidos em perdas (verde) e ganhos (vermelho) presentes em cada via canônica. Ao lado de cada barra, está demonstrado o total de genes que participam da via (banco de dados *Ingenuity System*). Os scores para cada via são calculados pelo teste exato de *Fischer* e são iguais a  $-\log$  (valor de *P*) (linha laranja). Imagens geradas pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA).

**Tabela 9.** Relação dos genes alterados nas cinco vias canônicas que apresentaram os maiores scores (6,43 a 1,09).

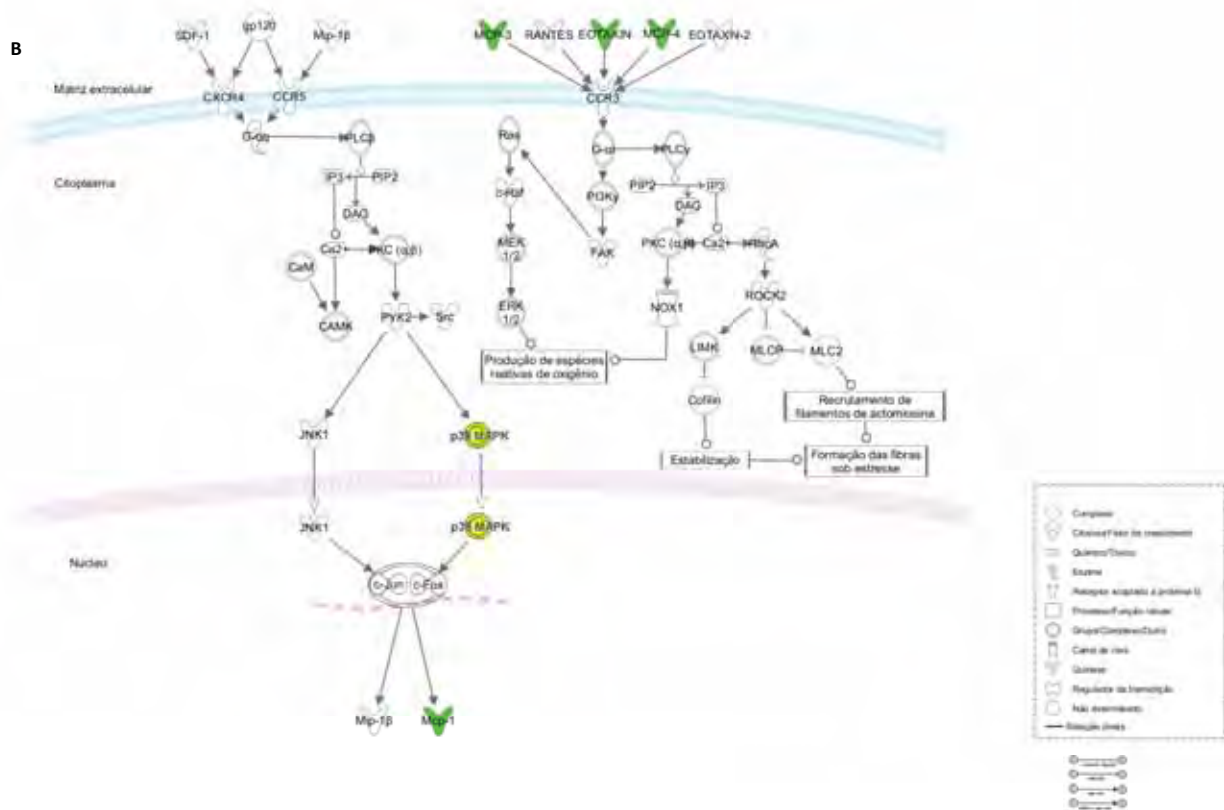
| Via canônica                  | Score | Genes alterados*                                                                                      |
|-------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sinalização ILK               | 2,67  | ↑MAP2K4 (ou JNK), ↑ ou ↓MAPK12, ↑Miosina (MYH1, MYH2, MYH3, MYH4, MYH8 e MYH13), ↑PPP2R2B (ou PP2A)   |
| Sinalização de quimiocinas    | 1,9   | ↓CCL2 (ou MCP-1), ↓CCL7 (ou MCP-3), ↓CCL11 (ou EOTAXIN), ↓CCL4 (ou MCP-4), ↑ ou ↓MAPK11, ↑ ou ↓MAPK12 |
| Via da fibrose hepática       | 6,43  | ↓CCL2, ↑Miosina (MYH1, MYH2, MYH3, MYH4, MYH8 e MYH13)                                                |
| Sinalização da junção celular | 1,09  | ↑Miosina (MYH1, MYH2, MYH3, MYH4, MYH8 e MYH13), ↑PPP2R2B (ou PP2A)                                   |
| Sinalização do IL-17          | 3,06  | ↓CCL2 (ou MCP-1), ↓CCL11 (ou EOTAXIN), ↑MAP2K4 (ou JNK), ↑ ou ↓MAPK11, ↑ ou ↓MAPK12                   |

<sup>a</sup> ↑: ganho, ↓: perda

**A**



B



C

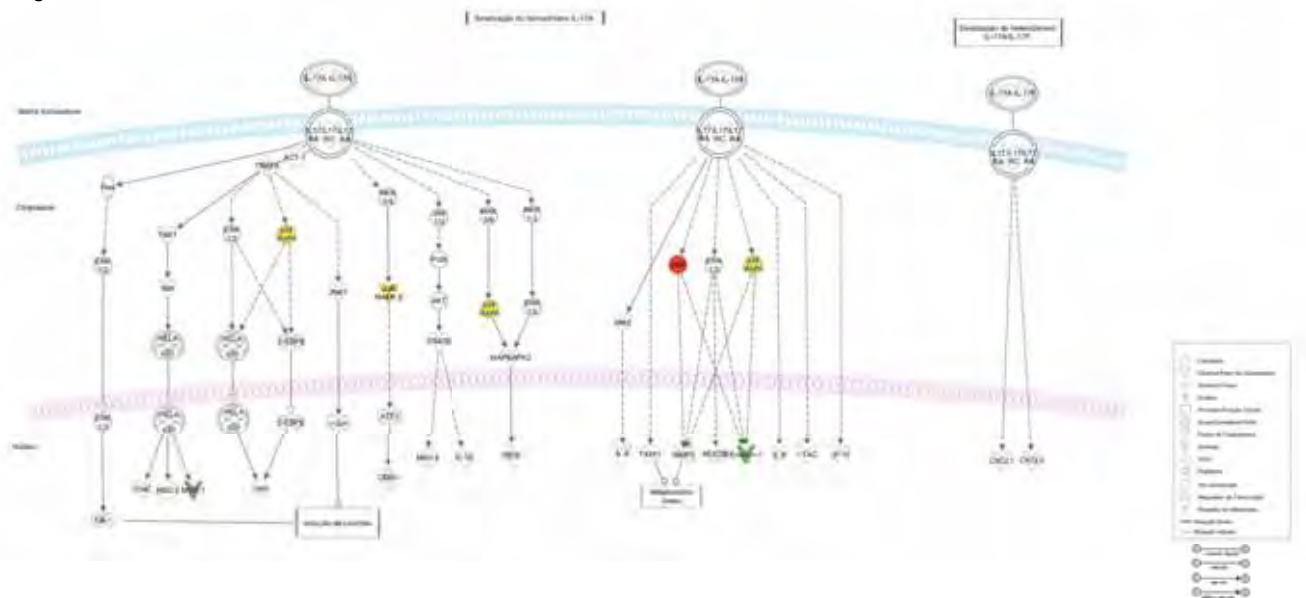


**Figura 25.** Representação esquemática das vias canônicas mais relevantes associadas com genes alterados em  $\geq 20\%$  das lesões DIE. (A) Via de sinalização do ILK. (B) Via de sinalização de quimiocinas. (C) Via de sinalização do IL-17. Em vermelho estão representados genes envolvidos em ganhos, verde para perdas genômicas, em amarelo os genes que apresentaram ganho e perdas genômicas, e branco para moléculas incorporadas com base no banco de dados do software. Imagens geradas pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA).

**Tabela 10.** Descrição dos genes (em **negrito**, genes alterados quanto ao número de cópias) envolvidos nas principais redes canônicas detectados nas lesões de EDT intestinal.

| Rede gênica | Funções                                                                                                         | Score | No. Genes alterados | Genes <sup>a</sup>                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1           | Motilidade celular, função e desenvolvimento do sistema hematológico, tráfego de células do sistema imunológico | 27    | 15                  | <i>Alp, C1q, ↓CCL1, ↓CCL2, ↓CCL7, ↓CCL8, ↓CCL11, ↓CCL13, CCR2, CXR4, F3, ↑GAS7, IFNG, IL13, IL25, IL1B, Immunoglobulin, ↑JAKMIP2, ↑MAP2K4, MAP2K7, MAP3K1, MAPK9, ↑MAPK11, ↑MOV10VL1, PGF, PTGS2, RETN, RNASE1, ↑SBF1, ↑SCO2, TNF, TNFR2F12A, ↑TYMP, ↑WNT5A</i> |
| 2           | Desenvolvimento, crescimento e proliferação celular                                                             | 9     | 6                   | <i>↓BNIP3, CDKN1A, CTSD, ESR1, HDAC1, HDAC2, Hsp70, ↑MAPK12, MBD2, MLL, MLL2, MTA1, ↑ODF3B, ↑PPP2R2B, ↑PPP6R2, ↑SHANK3, SNAI2, SP1, SP3, TERT, TFF1, TP53</i>                                                                                                   |

<sup>a</sup>↓: perda; ↑: ganho.

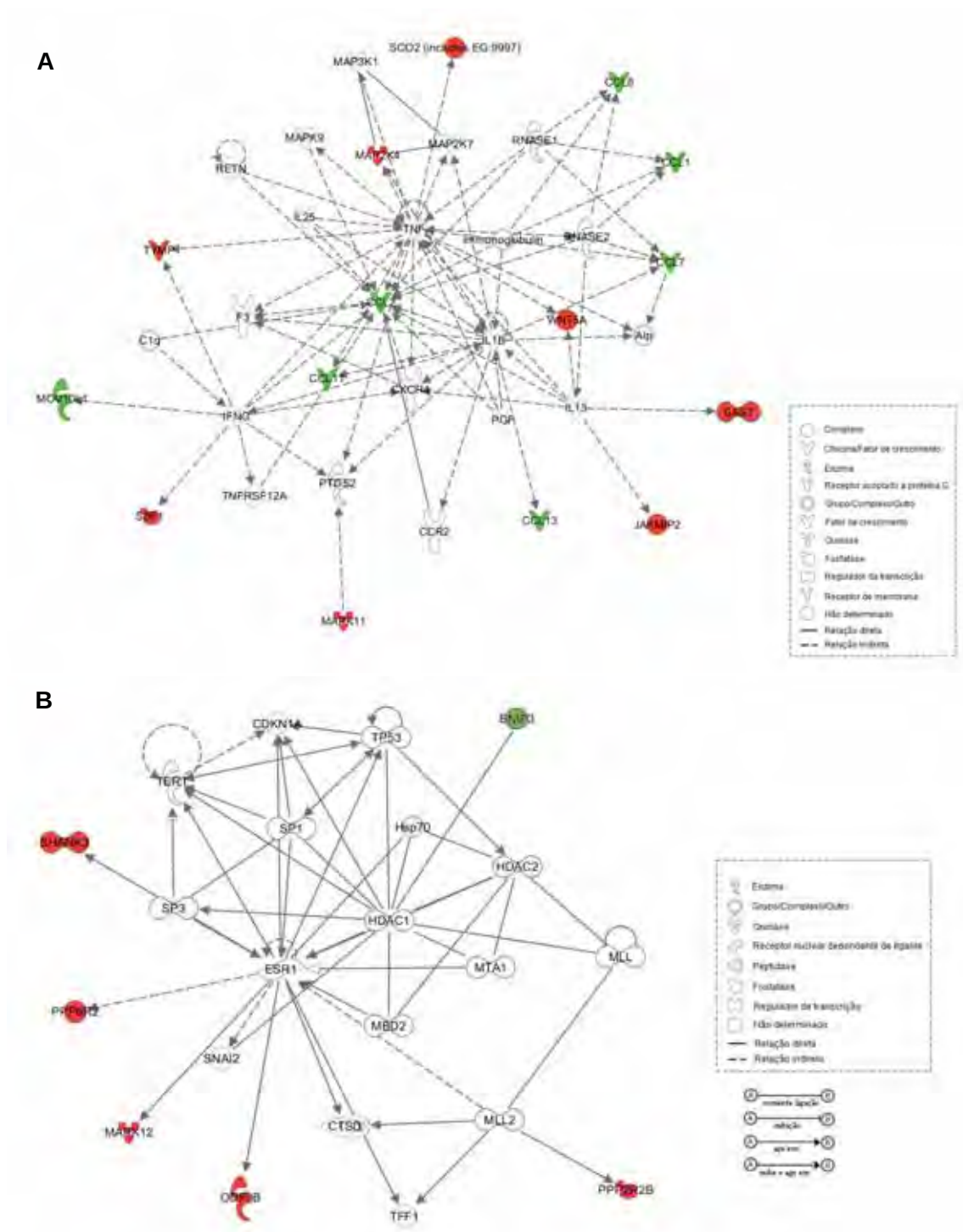


**Figura 26.** Representação esquemática de duas redes baseadas nos genes envolvidos em ganhos e perdas genômicas na EDT intestinal com maiores scores de alteração (27 e 9). Em (A) está representada a via de motilidade celular, desenvolvimento e função do sistema hematológico, tráfego de células do sistema imunológico e em (B) desenvolvimento, crescimento e proliferação celular. Em vermelho estão representados genes envolvidos em ganhos, verde para perdas genômicas, em amarelo os genes que apresentaram ganho e perdas genômicas, e branco para moléculas incorporadas com base no banco de dados do software. Imagens geradas pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA).

**Discussão**



## 5. DISCUSSÃO

A EDT é uma afecção ginecológica heterogênea, complexa e agressiva (Yang et al., 2004). Apesar de ser considerada uma doença benigna, a EDT pode apresentar aspectos de comportamento maligno como a proliferação clonal (Wu et al., 2003) e a propensão à metástase e invasão tecidual (Swiersz, 2002). Alterações genéticas envolvidas na gênese e na progressão de tumores ginecológicos vêm sendo amplamente investigadas e identificadas na EDT, sugerindo que o desenvolvimento desta doença pode ser resultado de alterações da expressão de proto-oncogenes e genes supressores de tumor (Hitti et al., 1990; Lee et al., 1992; Jimbo et al., 1997; Mommers et al., 1998; Nezhat et al., 2002).

Considerando as características genéticas da EDT, os estudos que permitem a triagem de alterações genômicas em amostras de tecido endometriótico podem ser bastante informativos na busca por marcadores genéticos para a doença, além de contribuir para a compreensão e definição de sua origem.

### 5.1. Grupo I – EDT em diferentes sítios

Neste estudo, a metodologia da HR-CGH foi utilizada para a triagem de ganhos e perdas de DNA em 20 amostras de EDT microdissecadas provenientes de oito pacientes distintas. A realização de procedimentos de LCM é essencial nos métodos triagem de alterações genômicas já que a segurança e sensibilidade desta metodologia são estritamente dependentes da homogeneidade das amostras de DNA isoladas. Se a amostra de DNA contém mais de 50% de células não representativas da lesão (por exemplo: células normais adjacentes), as alterações em células esporádicas ou em

baixas frequências, incluindo monossomias e trissomias escapam da detecção (para revisão, Rogatto et al., 2000).

Assim, a microdissecção é uma opção importante quando se pretende investigar populações celulares específicas. Particularmente, o estudo de populações celulares específicas na EDT permite avaliar as interações epitélio-estroma no desenvolvimento da doença. Por isso, neste estudo, as células endometriais do estroma e epitélio das EDT foram microdissecadas separadamente quando presentes em quantidades representativas.

Assim como em outros relatos da literatura, a análises da CGH deste estudo foram precedidas pela amplificação do DNAs genômico total, já que as análises genéticas de células adquiridas por procedimentos de microdissecção a laser é significativamente limitada pela quantidade insuficiente de DNA. Neste projeto, a amplificação do DNA genômico foi baseada no método de SCOMP (*Single-cell comparative genomic hybridization*). A elevada reprodutibilidade e sensibilidade dessa metodologia tornaram-se amplamente evidentes em análises de CGH realizadas em amostras a fresco (Klein et al., 1999) e fixadas em formalina e em blocos de parafina (Stoecklein et al., 2002). Embora alguns autores tenham relatado amplificação preferencial de algumas regiões (Telenius et al., 1992; Cheung et al., 1996), a utilização de intervalos de referência para a análise da CGH, como usada neste estudo, tem possibilitado a pesquisa genética do DNA amplificado semelhante a outros relatos (Kirchhoff et al., 1997; 1998).

As análises de HR-CGH em lesões endometrióides de diferentes localizações demonstraram uma média de 68 alterações genômicas em cada amostra avaliada. Essas alterações detectadas foram mais prevalentes nas células estromais que nas epiteliais. Semelhante ao estudo de Guo et al. (2004), as perdas genômicas foram aparentemente mais frequentes que os ganhos cromossômicos.

A literatura atual é bastante controversa em relação aos aspectos genéticos da EDT e há um número muito limitado de estudos por esta metodologia. Há relatos demonstrando total ausência de alterações cromossômicas significativas nas amostras de EDT (Mhawech et al., 2002), bem como a detecção de inúmeras regiões cromossômicas alteradas (Gogusev et al., 1999; 2000). Para o nosso conhecimento, não foram realizadas microdissecções nas amostras avaliadas nestes estudos. Dessa forma, essa discrepância de resultados pode ser explicada pela contaminação com populações celulares normais adjacentes, bem como pelas diferenças no número das amostras estudadas.

Utilizando a CGH convencional, Gogusev et al. (2000) também observaram a prevalência de perdas genômicas na EDT. Especificamente nas lesões peritoneais e ovarianas, foi observada uma alta frequência de deleções em regiões dos cromossomos 1, 22 e X. Adicionalmente, uma variedade de estudos tem identificado que perdas de heterozigose são achados comuns na EDT, especialmente envolvendo segmentos dos cromossomos 1, 5, 6, 9, 10, 11, 17 e 22 (revisado em Kobayashi et al., 2009). Neste estudo, a análise comparativa das diferentes amostras microdissecadas de EDT demonstrou que as regiões genômicas mínimas envolvidas em perdas afetavam todos os cromossomos. A alta frequência de perdas em diferentes regiões cromossômicas observada neste estudo e por outros autores parece sugerir que a inativação de genes supressores é um evento crítico na patogênese da EDT.

Foi também observada considerável heterogeneidade no padrão de alterações genômicas entre os casos estudados. De maneira semelhante, esta heterogeneidade também foi relatada por Guo et al. (2004) após avaliar cinco amostras microdissecadas de EDT utilizando a metodologia da aCGH. Essa heterogeneidade pode estar associada às diferenças na idade das pacientes, do estágio da doença e período do ciclo menstrual à exérese da lesão endometrióide. Entretanto, a análise comparativa entre os múltiplos

focos de EDT em seis casos (FC01-0189, FC03-0248, FC03-0519, FC03-1965, FC04-1080 e FC04-1132) revelou alterações genômicas consistentes. Nestes casos, a comparação dos perfis de alteração das diferentes lesões derivadas da mesma paciente demonstrou a predominância de regiões comuns envolvidas em perdas e ganhos, combinadas com a presença de algumas alterações exclusivas de cada foco endometrióide avaliado.

Perfis genéticos e, em alguns casos, fenotípicos semelhantes indicam a existência de uma relação clonal entre as diferentes lesões celulares. A proliferação clonal é uma característica fundamental de todas as neoplasias (Nowell, 1976; Levy, 2001). Uma célula neoplásica origina suas células filhas com a mesma alteração, podendo promover alguma vantagem relacionada a proliferação celular. No estudo do câncer, as análises moleculares bem como a triagem de anormalidades citogenéticas presente em diferentes sítios tumorais derivadas de uma mesma paciente são ferramentas importantes para a investigação da possível relação genética comum entre os múltiplos focos da doença (Jones et al., 2005; Speel et al., 2008). Para o nosso conhecimento, não há em literatura estudos consistentes que correlacionam o perfil de alterações genéticas entre diferentes sítios de EDT de uma paciente. Baseando-se em análises de clonalidade, alguns estudos enfatizaram a origem monoclonal da endometriose (Nilbert et al., 1995; Jiang et al., 1996; Jimbo et al., 1997; Tamura et al., 1998; Mayr et al., 2003; Nabeshima et al., 2003; Wu et al., 2003). Utilizando análise de inativação do cromossomo X em 38 amostras de 18 pacientes, Wu et al. (2003) demonstraram que as lesões eram monoclonais; entretanto, a análise de clonalidade de múltiplos focos de EDT provenientes de uma paciente demonstraram que essas lesões apresentavam origens independentes. Por outro lado, dados em literatura baseados em características do fluido peritoneal e na distribuição anatômica dos focos de EDT em diferentes mulheres, sugerem que as lesões superficiais e ou invasivas presentes na mesma paciente apresentam a mesma etiologia (Chapron et

al., 2006; Bricou et al., 2008). Em adição com os resultados deste estudo, esses achados podem ser indicativos de que focos de EDT compartilham uma origem comum.

Outro achado interessante deste estudo foi a presença de um perfil genômico normal no endométrio típico de três pacientes com diferentes sítios de EDT. Muitos estudos em literatura têm investigado as características celulares e biomoleculares da EDT em comparação com o endométrio típico na tentativa de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento das lesões endometrióticas. Ao contrário do nosso estudo, alguns relatos demonstram a presença de alterações genômicas (Guo et al., 2004) ou perfis anormais de expressão gênica (Wu et al., 2006; Eyster et al., 2007) no endométrio de portadoras de EDT. Semelhante ao nosso estudo, a maioria deles realizou microdissecção a laser nas amostras de endométrio e as alterações foram identificadas no epitélio endometrial (Guo et al., 2004; Wu et al., 2006). No presente estudo, o padrão genômico normal pode ser indicativo de que o conjunto de alterações genômicas observadas no endométrio típico de pacientes com EDT esteja restrito a uma população celular específica que não estava presente ou encontrava-se diluída entre o total de células microdissecadas.

Atualmente, é bem estabelecida em literatura a importância das interações entre as células epiteliais e estromais na manutenção da homeostasia tecidual bem como no comportamento biológico de diferentes neoplasias (Barcellos-Hoff e Medina, 2005). Em muitos tipos de tumores, o microambiente resultante dessa comunicação epitélio-estroma tem sido significativamente relacionado ao potencial proliferativo, invasivo e metastático das células tumorais (revisado por Pereira et al., 2005). No trato reprodutivo feminino, a interação entre as células endometriais do epitélio e estroma parece ser um ponto crítico para o desenvolvimento e sobrevivência do endométrio (Bhowmick et al., 2004). De maneira semelhante, muitos estudos têm relatado que o estabelecimento e desenvolvimento das lesões endometrióticas na superfície de órgãos intra-abdominais

envolve a participação ativa das células estromais e epiteliais do endométrio ectópico (revisado em Griffith et al., 2010). Nair et al. (2008) demonstraram *in vitro* que a capacidade e habilidade das células endometriais do estroma e epitélio em invadir a matriz extracelular do mesotélio peritoneal pode estar significativamente associada à alteração do perfil de expressão de alguns genes nas células endometriais e mesenquimais. Por essa razão, é importante o estudo dos aspectos genéticos envolvidos nas interações epitélio-estroma para a compreensão da origem e sobrevivência das lesões endometrióticas.

Considerando estes aspectos foi realizada uma análise individual dos dois componentes celulares das lesões endometrióticas selecionadas. Os resultados da HR-CGH demonstraram que as células estromais também apresentam alterações genômicas e, portanto, participam ativamente do desenvolvimento da EDT. A presença de alterações genômicas no componente estromal do endométrio ectópico também pode contribuir para a agressividade da doença, como a propensão à transformação maligna, já que o desenvolvimento e progressão tumoral são significativamente influenciados pelas células estromais adjacentes (Bhowmick et al., 2004).

Uma análise comparativa estroma/epitélio também foi realizada nas amostras microdissecadas de diferentes localizações e demonstrou-se a prevalência de alterações genômicas comuns para os dois tipos celulares, incluindo alta frequência de perdas e algumas regiões de ganhos, os quais não tinham sido identificadas como anormalidades comuns em análises anteriores do nosso estudo.

Foi realizada uma comparação entre as alterações presentes em EDT intestinal e lesões endometrióticas de outras localizações considerando separadamente cada componente celular. Esta análise comparativa revelou a existência de ganhos e perdas genômicas exclusivas no componente epitelial de lesões intestinais. Entretanto, a maioria

das alterações detectada no estroma de EDT em intestino era comum àquelas observadas no componente estromal de focos endometrióides de outros sítios.

Dentre as alterações comuns em estroma e epitélio do endométrio ectópicos de sítios distintos, as perdas genômicas foram predominantes e observadas em todos os cromossomos. Os ganhos comuns aos dois componentes celulares foram detectados em baixa frequência e envolveram principalmente as regiões dos cromossomos 1, 2, 3, 5, 7 e 11. Exceto em 1q (Gogusev et al., 2000), ganhos genômicos não foram consistentemente associadas ao desenvolvimento da EDT.

Os ganhos em 1q21-q23 foram detectados, neste estudo, nos dois componentes celulares endometrióides. As amplificações em 1q também foram previamente relatadas em EDT após análises de CGH convencional (Gogusev et al., 2000). A amplificação dessa região cromossômica tem sido associada com potencial metastático e resistência à quimioterapia em alguns tumores incluindo câncer de mama (Larramendy et al., 2000), carcinomas hepatocelulares (Guan et al., 2000) e sarcomas (Tarkkanen et al., 1995; Szymanska et al., 1997). Esta região contém genes interessantes, incluindo o *GIRK3*, *ATF6* e *DUSP12*, os quais estão intimamente envolvidos na promoção da proliferação celular e por isso representam potenciais genes candidatos nas lesões endometrióides com ganhos em 1q21-q23. As perdas genômicas em 1q (principalmente em 1q41-q43) também foram observadas nos componentes epiteliais e estromais. A perda de heterozigose no braço longo do cromossomo 1 tem sido frequentemente relatada em carcinomas ovarianos (revisado em Kobayashi et al., 2009). Para o nosso conhecimento, deleções envolvendo estes segmentos cromossômicos não foram relatadas em EDT.

As perdas em 1q41-q43 observadas neste estudo podem estar relacionadas à inativação do gene *EXO1* (*exonuclease 1* - 1q42-q43). Este gene codifica uma enzima com atividade exonuclease 5'-3' que participa ativamente dos processos de replicação,

recombinação e reparo a danos no DNA pela interação com a proteína hMSH2 (revisado em Liberti e Rasmussen, 2004).

A perda em 3p24-p25 foi um achado comum em células epiteliais e estromais de lesões endometrióides de diferentes localizações. Particularmente, a perda da região 3p24 foi exclusiva do epitélio endometrióide de lesões intestinais (6/9 amostras). Deleções envolvendo 3p foram freqüentemente relatadas em diferentes tipos de neoplasias, incluindo câncer de ovário (Cody et al., 2007; Yamamoto et al., 2008). Inúmeros genes supressores de tumor estão mapeados neste braço cromossômico. O gene *PPARG* (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) está mapeado em 3p25.1 e codifica um receptor nuclear envolvido no metabolismo energético celular, bem como nos processos apoptóticos e angiogênicos, regulando positiva ou negativamente a expressão de diferentes genes supressores tumorais e proto-oncogenes, respectivamente. A inativação do *PPARG* foi associada com câncer colorretal (Girnun et al., 2002), pulmonar (Sasaki et al., 2002), renal (Yuan et al., 2006), tireoidiano (Aldred et al., 2003) e leucemias (Silveira et al., 2009b). O gene *PPARG* também têm sido relatado como alterado em lesões endometrióides (Dogan et al., 2004; Ohama et al., 2008; Hwang et al., 2010; Sharma et al., 2011) bem como o seu potencial papel terapêutico na EDT (Lebovi et al., 2007; Kavoussi et al., 2009; Lebovic et al., 2010). Baseados nesses achados este gene pode estar associado com o desenvolvimento das lesões endometrióides.

A perda em 4q33 também foi uma alteração comum verificada no estroma e epitélio das lesões avaliadas. Embora esta alteração não esteja presente nas EDTs ovarianas, ela foi detectada no estroma de EDT para-tubárea, no estroma e epitélio de EDT em retro-cervical e em intestino. Especificamente, deleções em 4q33 também já foram relatadas em carcinoma de mama (Shivapurkar et al., 1999a) e pulmão (Shibapurkar et al., 1999b). Em 4q33, está mapeado o gene *NEK1* (*NIMA - never in*

*mitosis gene a - related kinase 1*) que codifica uma proteína envolvida na regulação negativa do ciclo celular e no reparo a danos de DNA (Chen et al., 2008). Apesar da importância de *NEK1* no metabolismo celular, este gene não tem sido correlacionado com o desenvolvimento de doenças genéticas.

Perdas genômicas em 5q34 foram observadas nos componentes epiteliais (5/6 casos) e estromais (3/4 casos). Estudos de ligação têm mostrado associação entre a perda de heterozigose em 5q e predisposição familiar à EDT (Bischoff e Simpson, 2000). Um potencial gene candidato mapeado nesta região é o *CCNG1* (5q32-q34). Este gene codifica a ciclina G1, uma proteína envolvida na regulação negativa do ciclo celular mediada pelos supressores tumorais *TP53* e *RB* (Zhao et al., 2003). Somados ao nosso achado, esses dados sugerem que a inativação de *CCNG1* pode ter um papel importante no desenvolvimento das lesões endometrióticas ectópicas.

A deleção em 6q24 foi um achado freqüente nos componentes epiteliais e estromais das amostras aqui estudadas. Perdas envolvendo esta região também foram exclusivamente identificadas no epitélio de lesões intestinais (5/9 amostras) e no estroma de um caso de EDT ovariana (FC03-0519 OE). Na análise comparativa de múltiplos focos de EDT da mesma paciente, foi significativa a deleção de 6q24. Essa alteração também foi identificada em endometriomas ovarianos após análise de CGH convencional (Gogusev et al., 1999). Em 6q24, está mapeado o gene *PLAGL1* (*pleomorphic adenoma gene-like 1*). Este gene codifica uma proteína supressora tumoral com domínio *zinc finger* envolvida no controle da expressão do gene *TP21* por meio da interação inter-protéica com *TP53* e *HDAC1* (*histone deacetylase 1*). Esses dados podem sugerir o envolvimento deste gene na patogênese da EDT.

Perdas na região 7p14-p21 foi um achado comum nas células estromais e epiteliais das diferentes lesões endometrióticas avaliadas. A deleção em 7p14-p15 foi observada como alteração exclusiva do estroma de EDTs intestinais (6/9 amostras). Em

literatura, perdas genômicas em 7p14-p22 foram previamente relatadas em 22% EDT de estágio avançado (total de 18 casos) após análises de CGH cromossômica (Gogusev et al., 1999; 2000). Zondervan et al. (2007), utilizando marcadores localizados em 7p, sugeriram a presença de um ou mais genes de alta penetrância envolvidos na etiologia da EDT familiar (Zondervan et al., 2007). Recentemente, a triagem genômica de 3.194 mulheres com EDT também demonstrou que variações polimórficas em 7p15.2 estão associadas com o desenvolvimento da doença (Painter et al., 2011). O banco de dados do genoma humano mais recente (NCBI 37) mostra que a região 7p14-p21 envolve uma ampla variedade de genes compatíveis com a perda de função e que apresentam funções críticas no metabolismo celular. Particularmente, o gene *SEPT7* (*septin 7* – 7p14.3-14.1) com função associada a localização de cinetócoros, quando deletado resulta na perda de segregação dos cromossomos com a perda da proteína CENP-E (Zhu et al., 2008). O gene *INHBA* (*inhibin, beta A* – 7p13-p15), também mapeado nesta região, é um candidato a supressor tumoral por atuar inibindo o crescimento celular em cânceres de mama (Reis et al., 2004).

A perda em 9p21 foi um achado freqüente neste estudo sendo observada no estroma e epitélio. Em lesões endometrióides de bexiga, foi significativa a perda de 9p21. Em literatura, alguns estudos têm relatado a perda de heterozigose de 9p21 em amostras de EDT (Jiang et al., 1996; Bischoff e Simpson, 2000; Goumenou et al., 2001) como também em lesões endometrióides associadas a adenocarcinomas de células claras (Yamamoto et al., 2008). Além disso, em carcinomas ovarianos, a perda de heterozigose em 9p21 também foi freqüentemente observada em estágios iniciais da tumorigênese e associadas a tumores de baixo grau (Campbell et al., 1995). Nesta região, está mapeado o gene supressor tumoral *CDKN2A/TP16*, o qual codifica um inibidor de quinase ciclina-dependente, responsável pela regulação negativa do ciclo celular. A perda de função de *TP16* tem sido amplamente associada ao início da carcinogênese (Shiozawa et al., 1997; Nakashima et al., 1999). No carcinoma de endométrio, Milde-Langosch et al. (2001)

relataram que a diminuição da expressão deste gene é um evento precoce na transformação neoplásica. Especificamente, Goumenou et al. (2006), após análises de imuno-histoquímica, revelaram a ausência de expressão da proteína p16 em 85% dos 25 amostras de lesões de EDT coletadas durante a fase proliferativa do ciclo menstrual. Esses dados sugerem de que a inativação de *TP16* pode estar associada ao desenvolvimento das lesões EDT.

Ganhos comuns em 11q12-q13 foram detectados nos dois componentes celulares das lesões endometrióides. Pela aCGH, ganhos em 11q13 foram associados a expressão aumentada do *CCND1* (*cyclin D1*) em carcinomas de nasofaringe (Hui et al., 2005). O gene *CCND1* está mapeado em 11q13 e codifica uma ciclina envolvida na regulação do ciclo celular via interação com a proteína RB. Estes dados sugerem que este gene é um potencial candidato para ganhos nesta região. Outro gene candidato mapeado em 11q13 é a *CCTN* (cortactina). A expressão aumentada de *CCTN* está associada com a inibição da degradação (via ubiquitinação) do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), resultando na atividade contínua desse receptor (van Rossum et al., 2005). Além disso, a expressão elevada de *CCTN* está associada com resistência ao *gefitinib*, um inibidor de EGFR (Timpson et al., 2007), indicando que a cortactina não afeta apenas a capacidade proliferativa, mas também a resposta terapêutica. Clark et al. (2009) demonstraram que o *CCTN* também modula outros processos celulares associados com a sobrevivência do tumor, sugerindo o envolvimento deste gene na promoção e agressividade tumoral. Recentemente, nosso grupo identificou a expressão elevada da proteína CCTN em carcinomas de laringe, tanto no fronte de invasão como na superfície celular. Embora não significativo, Ambrosio et al. (2011) também verificaram a expressão aumentada desse gene em pacientes que apresentaram metástase em carcinomas de laringe. Esses resultados sugerem que a CCTN é um provável marcador de agressividade no fronte de invasão destes tumores (Ambrosio et al., 2011). Entretanto, para o nosso conhecimento, ganhos em 11q13 não foram relatados em EDT.

Deleções em 11q23-q24 foram comumente observados no estroma e epitélio dos focos de EDT avaliados neste estudo. Perdas de heterozigose em 11q23 foram previamente relatadas em EDT e em lesões endometrióides associadas a tumores ovarianos (Campbell e Thomas, 2001; Jiang et al., 1998) e a adenocarcinomas de células claras (Yamamoto et al., 2008). Além disso, a alta frequência de perdas alélicas envolvendo 11q observada em uma grande variedade de tumores humanos incluindo carcinomas mamários e ovarianos sugere que esta região cromossômica pode conter genes importantes envolvidos na regulação de diferentes processos celulares (revisado em Viganò et al., 2006; Kobayashi et al., 2009). O gene *PGR* codifica o receptor de progesterona e está mapeado em 11q23. No endométrio humano normal, o *PGR* desempenha um papel fundamental na sinalização dos efeitos fisiológicos da progesterona e, conseqüentemente, na regulação da proliferação e sobrevivência das células endometriais (Mulac-Jericevic e Conneely, 2005). Na EDT, a proliferação contínua das células endometrióides está direta ou indiretamente associada a alterações moleculares específicas incluindo a resistência à ação da progesterona no tecido endometrial (Bulun et al., 2010; Cakmak e Taylor, 2010). Embora Treolar et al. (2005) não tenham detectado variantes polimórficas de *PGR* em lesões endometrióides, alguns estudos em populações caucasianas tem correlacionado a presença de polimorfismos funcionais no intron G deste gene com o desenvolvimento de EDT (Wieser et al., 2002; Lattuada et al., 2004). Baseados nesses dados, o *PGR* pode ser um potencial gene candidato envolvido nas deleções em 11q observadas neste estudo.

A perda em 12q24.1 também foi observada nos componentes estromais e epiteliais das amostras estudadas. As perdas em 12q24.1 também foram relatadas em carcinoma pancreático e associadas à inativação do gene *TU12B1-TY*. Embora a função deste gene não esteja completamente elucidada, acredita-se que codifica uma proteína com domínio de transmembrana. Contudo, para o nosso conhecimento, perdas nessa região não foram observadas em lesões endometrióides (Yatsuoka et al., 2004).

A perda envolvendo 16q22-q23 foi observada nos componentes epiteliais e estromais das EDT. Nesta região cromossômica está mapeado o gene *CDH1/E-caderina* (16q22.1) responsável pela síntese de uma proteína de adesão celular dependente de cálcio responsável pelo reconhecimento célula-célula e adesão celular (Cavallaro et al., 2006). Além da sua função na manutenção do contato celular, a E-caderina também atua modulando os níveis citoplasmáticos da  $\beta$ -catenina no processo de sinalização celular (Sasaki et al., 2000). Alterações no complexo E-caderina-catenina foram associadas com a progressão no câncer pelo aumento proliferação, invasão e metástase em vários tipos de tumores, incluindo o câncer de mama e próstata (Cheng et al., 1996; De Leeuw et al., 1997). Na EDT, a expressão de *CDH1* é controversa. Embora alguns pesquisadores tenham encontrado expressão elevada de *CDH1* em EDT (Beliard et al., 1997; Ueda et al., 2002), a maioria dos estudos relata expressão diminuída nas lesões endometrióticas (van der Linden et al., 1994; Gaetje et al., 1997; Scotti et al., 2000; Poncelet et al., 2002) e associa esta alteração com o potencial invasivo das células endometrióticas (Gaejje et al., 1997; Wu et al., 2007; Van Patten et al., 2010).

Foram também identificadas perdas significativas em 18q12-q21 e 18qq22-q23 nos dois componentes celulares (estroma e epitélio). Perdas de heterozigose em 18q foram observadas em adenocarcinomas de ovário (Yamamoto et al., 2008) mas, para o nosso conhecimento, não foi descrita em EDT. Em 18q22-q23 está mapeado o gene supressor tumoral *CDH19* (*cadherin 19*), uma caderina de adesão que quando inativada contribui para a invasão e progressão tumoral (Blons et al., 2002). Em 18q21 encontra-se mapeado o gene supressor tumoral *SMAD4* (18q21.1), que foi relatado como deletado ou com expressão diminuída numa variedade de tumores malignos (Hahn et al., 1998; Takei et al., 1998; Takakura et al., 1999; Natsugoe et al., 2002; Xie et al., 2003; Reinacher-Schick et al., 2004; Deckers et al., 2006). A ausência ou diminuição da atividade do *SMAD4* diminui a responsividade do *TGFB1* (ou *TGF- $\beta$* ) (Grady, 2005; Willman e Hromas, 2006).

O gene *TGF- $\beta$ 1* está mapeado em 19q13.2 e codifica um peptídeo multifuncional que atua como um mediador parácrino e autócrino importante da interação epitélio-estroma. Entre outras funções, o TGF- $\beta$  age com um inibidor da proliferação e diferenciação das células epiteliais (revisado em Bhowmick et al., 2004). Neste estudo, a análise comparativa estroma:epitélio demonstrou perda comum em 19q13 envolvendo os dois componentes celulares. De maneira semelhante, Guo et al. (2004) também identificaram perda em 19q13 em uma lesão endometriótica ovariana, de estadiamento I, proveniente de uma paciente de 40 anos de idade, após análise de aCGH.

Em literatura tem sido exaustivamente demonstrada a participação do TGF- $\beta$  nas diferentes etapas do ciclo menstrual e sua ação no controle da proliferação e diferenciação celular do epitélio e estroma endometrial (revisado em Omwandho et al., 2010). Polimorfismos funcionais no gene *TGF- $\beta$*  foram descritos e associados ao aumento do risco de desenvolver lesões endometrióides (Hsieh et al., 2005; van Kaam et al., 2007). Johnson et al. (2005), relataram diminuição dos níveis de transcrito e protéico do *TGF- $\beta$*  no endométrio ectópico de portadoras de endometriose. Recentemente, Paiva et al. (2010) demonstraram que a baixa expressão de *TGF- $\beta$ 1*, e do receptor *TGF- $\beta$ RII*, foi significativamente associada com carcinomas mamários, principalmente nos casos que apresentaram metástase a distância. Esses dados sugerem que a inativação de *TGF- $\beta$ 1* pode contribuir para o desenvolvimento de lesões endometrióticas ectópicas como consequência da redução da apoptose e aumento da proliferação celular.

A perda de heterozigose em 22q, onde está mapeado o gene *PLA2G6* (*phospholipase A2, group VI* - 22q13.1), foi relatada no endométrio ectópico de pacientes com EDT (Jiang et al., 1998; Thomas e Campbell, 2000. Campbell e Thomas, 2001; Yamamoto et al., 2008). Perdas em 22q foram relatadas também por CGH cromossômico (Gogusev et al., 1999; 2000). A perda genômica em 22q13 foi um achado freqüente nas células estromais e epiteliais dos focos de EDT de diferentes localizações e detectada

como alteração exclusiva no estroma de lesões intestinais (6/9 amostras). O gene *PLA2G6* codifica uma proteína do tipo fosfolipase que atua como mediadora do processo apoptótico e participa do metabolismo celular (Pérez et al., 2004). Variantes polimórficas funcionais do gene *PLA2G6* foram recentemente associadas com risco aumentado de desenvolver melanoma (Falchi et al., 2009).

Neste estudo, foram identificados ganhos e perdas genômicas exclusivas de cada tipo celular, embora em menor frequência quando comparadas com as alterações comuns. Um achado interessante foi que essas alterações foram observadas quase que exclusivamente no componente estromal e envolveram principalmente ganhos genômicos.

Entre estas alterações exclusivas a cada componente, estão incluídas as regiões 1q21-q23, 4q12-q26, 6q12-q15, 6q16-q21, 8q11.2-q13 e Xq12-q21. Ganhos em 1q foram detectados em amostras de carcinoma ovariano associadas à EDT em ovário (Mhawech et al., 2002) e em linhagens celulares derivadas de lesões endometrióides (Gogusev et al., 2000) por ensaios de CGH cromossômico. Especificamente, ganhos em 1q21-q23, como observado em nosso estudo, foram associadas à amplificação dos genes *FLG* (*filaggrin*), *NTRK1* (*neurotrophic tyrosine kinase receptor, type 1*), e *SPRR3* (*small proline rich protein 3*) em sarcomas humanos (Lushnikova et al., 2000).

A presença de ganhos nos cromossomos 4, 8 e X também foi previamente relatada em linhagens celulares endometrióides avaliadas após bandamento R (Bouquet de Jolinière et al., 1997). Ganhos em 6q14-q27 foram observados em EDT após análises da CGH cromossômico em focos endometrióides (Gogusev et al., 1999). Até o momento, estas alterações não foram associadas a potenciais genes candidatos para EDT.

Perdas genômicas exclusivas também foram observadas nas células estromais e envolveram principalmente 1p36.1-p36.3, 5p15.1-p15.3, 8p21-p23 e 19p13.1-p13.3. Não foram relatadas alterações nas demais regiões em EDT, excetuando-se os segmentos

em 1p e 5p. Em literatura, perdas em 1p foram previamente relatadas em EDT (Gogusev et al., 1999) e em carcinomas ovarianos (Yamamoto et al., 2008). Semelhante ao nosso achado, deleção em 1p36.2-p36.3 foi relatada em duas amostras de EDT microdissecadas a laser (Guo et al., 2004). Nesta região, estão mapeados cinco genes que codificam receptores do fator de necrose tumoral (*TNFRSF1B*, *TNFRSF12*, *TNFRSF12L*, *TNFRSF14* e *TNFRSF18*) e *TP73* (um gene supressor tumoral homólogo ao *TP53*). A família de receptores TNF está intimamente envolvida na ativação do processo apoptótico (Pimentel-Muinos et al., 1999). A inativação de *TP73* (por hipermetilação da região promotora, deleção e perda de expressão) foi correlacionada com o desenvolvimento de tumores oligodendrogliais (Dong et al., 2002). Outro potencial gene candidato localizado nesta região é o *APITD1* (*apoptosis-inducing, TAF9-like domain 1*). A proteína APITD1 está envolvida na regulação da morte celular programada e foi considerada como um possível marcador em neuroblastoma (revisado em Kobayashi et al., 2009). Semelhante aos nossos achados, Gogusev et al. (1999), utilizando CGH detectaram perdas em 5p em células endometrióides. Estudos prévios de alelotipagem revelaram alta frequência de LOH de diferentes regiões em 5p em alguns tumores humanos, incluindo câncer de tireóide (Califano et al., 1996) e leucemias (Takeuchi et al., 1995).

O componente epitelial apresentou ganhos em 4p12-p13 e perdas em 6p23 e Xq25 como alterações exclusivas, embora em baixa frequência. Especificamente, a deleção em 6p23 foram observadas nas células epiteliais de oito amostras de EDT (uma em ovário, quatro em intestino, uma em para-tubárea e uma em retro-cervical). Estudos de perda de heterozigose revelaram loci em 6p envolvidos na endometriose e em carcinomas ovarianos (Prowse et al., 2006). Nesta região estão mapeados os genes *JARID2* e *ATXN1*, os quais codificam proteínas responsáveis pela regulação da transcrição em células neurais (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genes>). Embora não tenham

sido correlacionados com o desenvolvimento de doenças genéticas, estes genes são potenciais candidatos associados a perdas em 6p23.

Ainda não foi completamente elucidado se as diferentes manifestações da EDT são categorias diferentes de uma única doença, se são doenças distintas, mas com características relacionadas, ou se representam vários processos patofisiológicos que determinam fenótipos distintos (Barlow e Kennedy, 2005). Entretanto, encontra-se bem estabelecido em literatura que o conjunto de alterações genéticas presentes nas células do endométrio ectópico associado a fatores relacionados ao microambiente influencia significativamente a localização, a severidade, e as características histológicas das lesões EDT (Guo et al., 2004).

Um achado interessante desse estudo foi a alta frequência de alterações genômicas comuns presentes nas células do estroma e do epitélio endometrial. Este dado sugere que a instabilidade genética observada nessas lesões pode ter origem nas células-tronco endometriais responsáveis pela formação e manutenção do estroma e epitélio endometrióide (Gargett, 2006). Por isso, em nosso estudo, foi avaliado o perfil de expressão protéica de um conjunto de oito marcadores de células-tronco (CD9, CD13, CD24, CD34 e CD133) nas amostras de EDT do Grupo I pela metodologia de IHQ.

Alguns estudos dão evidências sobre a presença de células-tronco no endométrio humano. Em literatura, achados clínicos (revisado em Gargett, 2007), a expressão de marcadores específicos de células-tronco (Forte et al., 2010), a propriedade clonogênica e monoclonal de células endometriais, além da capacidade de diferenciação notada em algumas células estromais e epiteliais do endométrio (Chan e Gargett, 2006; Gargett, 2007; Gargett et al., 2009) são alguns dados que sugerem a existência dessa população celular. No presente estudo, a prevalência de alterações genômicas comuns entre lesões avaliadas e a presença de células expressando marcadores de células-tronco nas lesões

endometrióides também são evidências do envolvimento das células progenitoras endometriais no desenvolvimento da EDT.

Até o presente, não foram estabelecidos marcadores específicos de células-tronco endometriais capazes de discriminá-las da progênie madura. Por isso, neste estudo, foram avaliadas algumas proteínas de membrana previamente relatadas como potenciais marcadores de células-tronco. Para o nosso conhecimento, alguns deles também já foram previamente utilizados em estudos de expressão protéica em tecidos endometriais (revisado em Gargett, 2007).

Não foi detectada a expressão dos marcadores CD13, CD24 e CD133 nas amostras de EDT e endométrio tópico avaliadas no presente estudo. Particularmente, a proteína CD13, conhecida como aminopeptidase N, é uma metaloproteinase de superfície celular e sua expressão em células progenitoras endometriais é bastante controversa. Ao contrário dos nossos achados, células CD13<sup>+</sup> já foram previamente identificadas no estroma e epitélio endometrial em diferentes fases do ciclo menstrual, principalmente no endométrio em fase secretória (Park et al., 2000; Seli et al., 2001). Por outro lado, Kato et al. (2007) relataram que uma fração significativa de células-tronco endometriais, especificamente as chamadas células periféricas (uma subpopulação de células-tronco, conhecida como *side population cells*), não expressavam CD13 mas eram geradoras de células estromais CD13<sup>+</sup>. Recentemente, Di Matteo et al. (2011) relataram que os diferentes anticorpos monoclonais específicos para CD13 disponíveis apresentam um padrão distinto de marcação em vasos e células estromais, o que poderia explicar em parte os achados controversos em literatura.

Como descrito anteriormente, a expressão dos marcadores CD24 e CD133 também foi negativa nas amostras avaliadas neste estudo. O CD24 é uma molécula de superfície associada com adesão celular expressa em uma variedade de células epiteliais (Lim e Oh, 2005), incluindo as ovarianas (Kristiansen et al., 2002; Santin et al., 2004).

Além disso, CD24 é considerado um importante marcador diagnóstico e prognóstico em diversos tipos de tumores ginecológicos e a expressão dessa proteína foi associada com baixa sobrevida em carcinomas ovarianos (Kristiansen et al., 2002). Após análises de RT-PCR quantitativa em tempo real, Kim et al. (2009) relataram que a expressão de CD24 em células endometriais é cíclica, ocorrendo baixa expressão dessa proteína na fase proliferativa, e aumento de expressão na fase secretória do ciclo menstrual. De maneira interessante, os autores também observaram a existência de uma correlação inversa entre a expressão do estrógeno e progesterona, e a expressão de CD24 (Kim et al., 2009). De fato, o aumento de expressão de *ER* é comumente descrito no endométrio tópico e ectópico de portadoras de EDT e é considerado um evento crítico no desenvolvimento da doença (Bulun et al., 2010). Neste contexto, a ausência de células CD24<sup>+</sup> observadas no endométrio tópico bem como nas lesões endometrióides pode estar associada à expressão aumentada do *ER* nestes tecidos, sugerindo que o CD24 pode não ser um bom marcador de células-tronco na EDT.

O CD133 é uma glicoproteína de membrana frequentemente expressa em células-tronco adultas e associada com a supressão da diferenciação celular. A expressão positiva desse marcador já foi previamente observada em células progenitoras provenientes de diferentes linhagens celulares (Yin et al., 1997; Belicchi et al., 2004; Kim et al., 2011), incluindo do epitélio endometrial normal (Schwab et al., 2008). Recentemente, a expressão de CD133 também foi detectada em tumores endometriais e associadas com pior prognóstico (Rutella et al., 2009; Nakamura et al., 2010). Ainda é bastante controversa a utilização do CD133 como marcador de células-tronco nos diferentes tumores humanos (Bidlemaier et al., 2008; Hermansen et al., 2011). Portanto, em combinação com nossos achados, o uso de CD133 como marcador de células-tronco na EDT precisa ainda ser criticamente avaliado.

Neste estudo, a expressão positiva de CD9 foi observada em células endometriais da camada basal do epitélio glandular em todas as amostras de EDT com epitélio representativo (n=13) bem como nas amostras de endométrio típico (n=3). O CD9 é uma glicoproteína de 24-27 kD e é comumente utilizado como um potencial marcador de células-tronco de origem mesenquimal. A expressão de CD9 foi verificada na membrana de células epiteliais endometriais (Park et al., 2000). Kato et al. (2007) também demonstraram a expressão positiva de CD9 em células endometriais, especificamente na progênie de células-tronco que se diferencia exclusivamente na linhagem epitelial. Adicionalmente, células CD9<sup>+</sup> foram verificadas na população de células-tronco endometriais isoladas do fluido menstrual (Meng et al., 2007). Em nosso estudo, a presença de células CD9<sup>+</sup> foi detectada em todas as lesões avaliadas, inclusive entre as diferentes lesões da mesma paciente. Esses achados sugerem que o CD9 é um potencial marcador de células-tronco endometriais e a presença de células CD9<sup>+</sup> nas lesões endometrióides em nosso estudo é indicativa do envolvimento das células progenitoras endometriais na patogênese da EDT.

De maneira semelhante, a expressão positiva de CD34 também foi um achado importante desse estudo. Exclusivamente no epitélio, a marcação CD34<sup>+</sup> foi detectada em células isoladas na camada basal nas 12 amostras com componente epitelial representativo. O CD34 é uma molécula de aproximadamente 110 kD que está expressa na superfície celular de células progenitoras hematopoiéticas e é considerado um marcador clássico de células-tronco. A expressão de CD34 foi previamente detectada Cho et al. (2004) em células do estroma e epitélio basal de endométrio independente da fase do ciclo, semelhante aos nossos achados. Segundo os autores, a marcação CD34<sup>+</sup>, combinada com a expressão de outros marcadores observados nessas células (incluindo o c-Kit), sugere a presença de um pequeno número de células-tronco endometriais latentes na camada basal do endométrio as quais podem deter a capacidade de promover a sua diferenciação mesenquimal (Cho et al., 2004). Interessantemente, a

expressão positiva do c-Kit também foi detectada em quatro lesões endometrióides (FC03-0248-RS, FC03-0519-S, FC03-1965-V, FC04-1181-S), reforçando as evidências sobre o envolvimento das células-tronco no desenvolvimento dessa doença.

De fato, alguns estudos demonstraram a expressão positiva de c-Kit em lesões endometrióides (Cho et al., 2004) bem como no fluido peritoneal de mulheres com EDT (Osuga et al., 2000) e a sua associação com células-tronco (Cho et al., 2004). O proto-oncogene c-Kit codifica um receptor de tirosina quinase que interage com ligantes específicos de células-tronco (Cho et al., 2004). A ativação dos receptores c-Kit também foi previamente associada com comportamento agressivo em tumores malignos e benignos, mas poucos estudos relatam sua expressão em EDT (revisado em Ha et al., 2010). Semelhante aos nossos achados, Pacchiarotti et al. (2011) relataram a co-expressão de c-Kit e Oct-4 em lesões endometrióides e isto é sugestivo do envolvimento de células progenitoras na patogênese da EDT.

Níveis significativamente aumentados de *OCT4* no estroma das lesões endometrióticas e do endométrio típico já foram previamente relatados por Forte et al. (2009), baseados em análises de RT-qPCR e imuno-histoquímica. Oct-4 é um importante marcador molecular de células-tronco e apresenta um papel crítico na manutenção do estado indiferenciado dessas células (Matthai et al., 2006). Este regulador transcricional embrionário é comumente expresso em vários cânceres e foi identificado em células epiteliais do endométrio típico normal (Chan et al., 2004; Schwab et al., 2005; Lynch et al., 2007; Kato et al., 2007; Du et al., 2007). A expressão positiva de Oct-4 também foi detectada neste estudo em cinco lesões endometrióides, das quais quatro co-expressavam c-Kit. Esses achados podem sugerir fortemente o papel das células-tronco no desenvolvimento da EDT.

Outro achado interessante deste estudo foi a presença de grande concentração de vasos CD34<sup>+</sup> no estroma de todas as amostras, principalmente próxima ao foco das

lesões endometrióides. Assim como demonstrado em outros estudos, a presença de vasos próximo dos focos endometrióides sugere que a angiogênese é um processo crucial no desenvolvimento da EDT (Matsuzaki et al., 2001; Inan et al., 2003). Sendo o CD34 um clássico marcador vascular e de células-tronco, a presença de marcação CD34<sup>+</sup> nos vasos associados às lesões endometrióides verificadas nesse estudo, somados aos achados da literatura, reforça a hipótese sobre o papel crítico do processo angiogênico associado ao desenvolvimento e sobrevivência das lesões EDT.

O presente estudo permitiu a identificação de alterações comuns no estroma e epitélio de diferentes sítios de EDT. Esses achados sugerem que o surgimento de lesões endometrióides em diferentes localizações podem ser resultantes da migração de células-tronco endometrióides anormais caracterizadas por alterações genéticas que conferem um potencial metastático, proliferativo e invasor. Em câncer, a correlação entre células-tronco malignas e metástases tem sido suportada por vários estudos. Neste modelo de progressão tumoral, acredita-se que as células-tronco teriam um potencial para originar um tumor secundário com características histológicas e heterogeneidade semelhante à neoplasia primária. O desenvolvimento de lesões secundárias ocorreria em um microambiente apropriado, que possibilitasse a proliferação e a sobrevivência das células precursoras anormais (revisado em Geiger e Peeper, 2009). Baseados neste modelo e nos resultados deste estudo, é bastante provável que o desenvolvimento de EDT em diferentes sítios esteja fortemente relacionado com a disseminação e com o potencial proliferativo das células-tronco endometrióides anormais em combinação com alterações no microambiente peritoneal.

A importância do estudo molecular em EDTs de diferentes localizações tem sido reconhecida não só pelo fato de auxiliar na compreensão dos mecanismos patogênicos envolvidos no desenvolvimento desta doença, como também pela possibilidade de se identificar alterações específicas em cada sítio da lesão. Alguns estudos já têm sugerido

que as endometrioses peritoneais e ovarianas apresentam características biológicas distintas, incluindo, por exemplo, diferenças no padrão de expressão de alguns genes e/ou proteínas apoptóticas (revisado em Nasu et al., 2009). Neste sentido, foi realizada neste estudo uma análise comparativa entre as regiões mínimas alteradas presentes especificamente em lesões endometrióides intestinais em relação àquelas observadas em EDTs em outros sítios (incluindo ovário, bexiga e outras localizações) indicando a presença de algumas alterações são exclusivas da EDT intestinal e que estas caracterizam principalmente o epitélio glandular. Por outro lado, algumas alterações envolvem as mesmas regiões genômicas em ambos os componentes celulares.

Os dados obtidos dão evidências sobre a associação não-casual da EDT de diferentes localizações na mesma paciente apresentando alterações genômicas similares e do possível envolvimento das células-tronco endometriais no desenvolvimento dessas lesões. Além disso, a identificação de alterações genômicas em regiões que abrigam proto-oncogenes e genes supressores tumorais sugerem um fenótipo semelhante ao observado em tumores humanos. A detecção de regiões cromossômicas alteradas é uma etapa fundamental para o conhecimento da biologia da doença, identificação de genes relacionados ao desenvolvimento da EDT e de marcadores moleculares para o diagnóstico da doença.

## **5.2. Grupo II – EDT infiltrativa em intestino**

As lesões endometrióides infiltrativas caracterizam uma entidade específica de EDT e estão frequentemente associadas com comportamento agressivo (Abrão et al., 2003) apresentando tendência à fibrose (revisado em Fraser, 2008), sintomas severos e recorrentes (revisado em Giudice, 2010), e, eventualmente, características dificultando a distinção entre a doença maligna e a inflamatória (Paksoy et al., 2005).

A possibilidade de transformação maligna da EDT profunda intestinal e seu caráter agressivo ressaltam a importância da realização de estudos moleculares nestas lesões. Assim sendo, a investigação dos aspectos genéticos e moleculares é fundamental para caracterizar a patogênese destas lesões e definir potenciais marcadores diagnósticos e alvos terapêuticos. Com esse propósito, foi realizada neste estudo a análise de variações no número de cópias genômicas pela aCGH em 18 amostras de EDT intestinais. Foram detectadas 585 alterações, em que os ganhos foram mais frequentes (54% de ganhos e 3,4% de ganhos em alto nível) que as perdas genômicas (42,6%). O alto número de alterações detectadas sugere a presença de instabilidade genômica na endometriose intestinal profunda.

Para nosso conhecimento, há um número limitado de dados em literatura utilizando CGH array em EDT. Guo et al. (2004) avaliaram o componente epitelial microdissecado a laser de cinco lesões endometrióides não infiltrativas (quatro amostras de endometrioma ovariano e uma de EDT peritoneal) e relataram alterações envolvendo diferentes cromossomos, destacando-se os ganhos em 3p14, 10q26 e 13q33, e perdas em 1p36.21–p36.33. No presente estudo, foi observado um número significativo alterações genômicas em todos casos avaliados envolvendo todos os cromossomos.

Zafrakas et al. (2008) também utilizaram a aCGH para avaliar alterações genômicas em amostras de EDT (EDT ovariana de estádios III e IV). A investigação de perdas e ganhos pela aCGH em plataforma contendo 5.659 clones (BACs) em triplicata demonstrou, ao contrário de nossos achados, a ausência de deleções e amplificações significativas (Zafrakas et al., 2008). Segundo os autores, a ausência de alterações genômicas recorrentes pode sugerir a heterogeneidade genética presente entre os casos avaliados. Entretanto, é importante considerar que as amostras analisadas não foram microdissecadas. Também na aCGH, os procedimentos de microdissecção são fundamentais para a triagem de alterações genômicas cuja sensibilidade é

significativamente dependente da homogeneidade das amostras de DNA isoladas (para revisão, Rogatto et al., 2000). Por isso, neste estudo, todas as amostras foram pré-processadas de modo a garantir mais de 80% de células representativas da lesão.

Neste estudo, os ganhos genômicos foram mais prevalentes que as perdas nas EDTs profundas avaliadas pela aCGH. Ao contrário dos nossos achados, dois estudos de triagem de alterações genômicas por CGH cromossômico (Gogusev et al., 1999) e aCGH (Guo et al., 2004) relataram alta frequência de perdas genômicas na EDT, especificamente em lesões endometrióides não infiltrativas. Particularmente, nossos achados de HR-CGH em diferentes implantes de EDT do Grupo I, que incluíam lesões intestinais infiltrativas, também revelaram alta frequência perdas genômicas. De maneira semelhante, controvérsias entre achados de aCGH e HR-CGH foram previamente relatados em literatura. Holzmann et al. (2004) utilizando BAC aCGH demonstraram que linhagens tumorais de pâncreas apresentaram um número significativamente maior de ganhos quando comparado com os dados derivados da análise anterior de CGH cromossômico nas mesmas amostras. De fato, essa discrepância entre os dados podem ser parcialmente resultantes das diferenças metodológicas existentes entre os dois procedimentos, principalmente em relação à sensibilidade, à resolução bem como ao tipo de análise estatística utilizada pelos diferentes *softwares* para a definição das alterações genômicas relevantes (Yano et al., 2004). Uma outra limitação refere-se ao fato que a análise de HR-CGH inclui todo o genoma e a plataforma de oligonucleotídeos utilizada para CGH array é limitada em número de genes e sequências genômicas (44K). Mesmo mediante essas desigualdades, alterações significativas verificadas pela HR-CGH nas amostras do Grupo I, algumas delas verificadas exclusivamente nas lesões intestinais profundas, foram confirmadas pela aCGH no Grupo II, incluindo ganho em 3p14.3 e perdas em 10q26.3 e 22q13.33, demonstrando a relevância dos achados deste estudo.

A presença significativa de ganhos genômicos nas lesões intestinais avaliadas pela aCGH sugerem que a ativação de proto-oncogenes pode ser um evento crítico na patogênese das EDTs profundas avaliadas. Proto-oncogenes codificam proteínas que coordenam processos celulares importantes incluindo a proliferação celular e apoptose. De fato, a ativação de proto-oncogenes tem sido freqüentemente relatada em diferentes tumores humanos de fenótipo agressivo e com potencial invasivo (Vasko et al., 2004; Zhai et al., 2011). Assim, nossos resultados sugerem que essas alterações podem ser relevantes na patogênese das EDT profundas e estar associadas com o caráter infiltrativo dessas lesões.

Alterações genômicas significativas e recorrentes (>20% dos casos) foram detectadas entre as 18 amostras de EDT intestinais avaliadas neste estudo e envolveram principalmente ganhos em 3p14.3, 5q32-q33.1, 6q16.1-q21, 10q22.3, 13q21.31-q21.32, 14q24.1-q24.2 e 17p12-p13.1, e perdas em 10q26.3, 11q21, 17q12 e 20q13.33. Essas alterações podem ser eventos chave no desenvolvimento e progressão da EDT, uma vez que estas alterações constituem um dos mecanismos pelos quais a expressão de proto-oncogenes e genes supressores tumorais pode ser afetada (Savas, 2010).

As regiões genômicas alteradas apresentaram tamanhos variáveis (0,62 a 4,2 Mb), com algumas delas contendo poucos genes. Particularmente, duas regiões apresentaram a alteração de genes únicos. O ganho em 13q21.31-q21.32 e a perda em 20q13.33 envolveram, respectivamente, os genes *PCDH9* e *CDH4*, envolvidos no reconhecimento célula-célula e adesão celular. Os genes e suas proteínas relacionadas à regulação de adesão celular foram implicados na patogênese da EDT e associados significativamente ao potencial invasivo e metastático das lesões (Zhao et al., 2009). Outras regiões de ganhos genômicos também foram detectadas em 6q16.3-q21, 10q22.3 e 14q24.1-q24.2 e envolveram genes associados à regulação da transcrição e ciclo

celular (*ASCC3* e *SFRSS*), metabolismo de proteínas (*HACE1*), transporte de íons e homeostasia celular (*GRIK2*, *KCNMA1* e *SLC10A1*).

No presente estudo, algumas regiões envolvidas em CNVs foram previamente relatadas na EDT após análises de CGH cromossômico (Gogusev et al., 1999; 2000), aCGH (Guo et al., 2004) e LOH (revisado em Viganò et al., 2006). Semelhante aos achados de Guo et al. (2004), ganho em 3p14 também foi significativamente observado neste estudo (4/18 casos). Para o nosso conhecimento, o aumento no número de cópias em 3p14 não é um evento freqüentemente observado em tumores ou lesões proliferativas. Entretanto, essa alteração foi previamente detectada em linhagens de câncer de mama (Zhao et al., 2004) e em tumores mamários (Ljuslinder et al., 2005) após análises de aCGH e Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH, do inglês *Fluorescence in situ Hybridization*). Neste estudo, a alteração nessa região envolveu ganhos em genes que participam do transporte de íons (*CACNA2D3*), sinalização celular e regulação da transcrição (*LRTM1*, *WNT5A* e *ERC2*). Particularmente, o *WNT5A* pertence a família de genes *WNT*, a qual tem sido freqüentemente associada a patogênese de diferentes tipos de tumores. Recentemente, Kim et al. (2010) descreveram o papel de *WNT5A* como importante mediador de resposta inflamatória em tecidos endoteliais. Além disso, foi também verificado ganhos envolvendo o gene *HESRG* (mapeado em 3p14.3) o qual codifica uma proteína específica que foi associada com a diferenciação de células-tronco embrionárias (Zhao et al., 2007). Para nosso conhecimento, esses genes não foram previamente relatados na EDT.

A perda em 10q26.3 também foi observada em mais de 20% das lesões de EDT intestinal. A região 10q26 já foi significativamente associado à suscetibilidade à endometriose após a análise de ligação em um conjunto de 1.176 famílias (Treolar et al., 2005). As perdas de seqüências mapeadas em 10q, incluindo 10q26, foram previamente associadas à progressão de carcinomas endometriais (Peiffer et al., 1995). Em nosso

estudo, essa alteração envolveu a deleção de genes associados à regulação da transcrição (*TCERGL*), transdução de sinal (*PPP2R2D* e *STK32C*), apoptose (*BNIP3*), comunicação e interação célula-célula (*INPP5A*). Ganhos em 5q32-q33.1 aqui detectados também coincidem com a localização de genes que participam desses mesmos processos biológicos.

A perda em 11q21 também foi um achado freqüente e detectado em cinco casos. Perdas alélicas envolvendo 11q foram observadas em uma grande variedade de tumores humanos incluindo carcinomas mamários e ovarianos. Esta região cromossômica pode conter genes importantes genes envolvidos na regulação de diferentes processos celulares (revisado em Viganò et al., 2006; Kobayashi et al., 2009). Em particular, a perda de 11q21 foi sugerida como contendo potencial marcador prognóstico no câncer de mama, associada a tumores ER positivos (receptor de estrógeno, do inglês *estrogen receptor*). Para o nosso conhecimento, alterações nesse loco não foram descritas na EDT. A perda em 11q21 observada nos casos avaliados nesse estudo envolveu genes implicados no controle do ciclo celular (*FUT4* e *SESN3*), regulação da transcrição (*AMOKDM4D* e *SFRS2B*) e tradução (*PIWIL4*) e comunicação celular (*AMOTL1*). Recentemente, a baixa expressão da proteína PIWIL4 foi identificada em carcinomas de colon com estadio avançado e associados com potencial invasivo (Li et al., 2010). Assim, o *PIWIL4* pode ser considerado um gene candidato interessante envolvido na patogênese das EDTs infiltrativas.

Alterações no cromossomo 17 também foram identificadas em mais de 20% das lesões endometrióides avaliadas, incluindo ganho em 17p12-p13.1 e perda em 17q12 (ambos em 5 dos 18 casos). Para o nosso conhecimento, essas alterações não foram previamente relatadas na EDT. O ganho em 17p observado neste estudo envolveu genes relacionados à proliferação (*GLP2R*), motilidade (*MYH* e *DNAH9*) e organização (*DNAH9*) celular, apoptose (*GLP2R*), transporte de íons (*SCO1*), regulação da transcrição (*ZNF18*),

transdução de sinal (*GAS7* e *MAP2K4*) e resposta imune (*MAP2K4*) associada à via de sinalização de receptores *Toll-like*.

As regiões alteradas podem ainda conter miRNAs, classe de pequenos RNAs não codificantes capazes de regular negativamente outros genes, agindo em diversos processos biológicos (Esquela-Kerscher e Slack, 2006). O ganho em 17p12-p13.1 envolveu o miRNA 744 (*mir744*). Evidências recentes sugerem que alterações em miRNAs estão relacionadas a alguns tipos de cânceres humanos (Croce, 2009), como também na EDT (Teague et al., 2010), indicando que essas pequenas moléculas podem funcionar como oncogenes ou genes supressores tumorais (Esquela-Kerscher e Slack, 2006). Até o momento, 1.048 miRNAs foram descritos no genoma humano de acordo com o banco de dados *mirBase* ([http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_summary.pl?org=hsa](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa), dados coletados em maio/2011). De acordo com o banco de dados da *U.S. National Library of Medicine* (acessado em Maio/2011), mais de dez estudos tem relatado o envolvimento dos miRNAs no desenvolvimento da doença, incluindo principalmente seqüências reguladoras associadas à angiogênese (Ramón et al., 2011) e proliferação celular (Ohlsson Teague et al., 2009). Para nosso conhecimento, o *mir744* não foi previamente relatado na EDT ou associado com cânceres ou outras doenças genéticas. De acordo com dados gerados na análise de função gênica, o *mir744* atua como regulador de genes alvos interessantes e que participam de importantes processos celulares, incluindo a sinalização de quinases (*PHKA2*, *RAPGEF1*), *ILK* (FLNA) e *EFG* (fator de crescimento epidermal) (*CSNK2A1*), organização do citoesqueleto (*ARHGEF1*), sinalização de *PDGF* (receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas) (*ABL2*) e do receptor de estrógeno (*TAF9B*), regulação da via do andrógeno (*CALML5*) e resposta inflamatória (*CALML5*, *CLDN5*, *CLDN15*, *ERF*, *EXOC4*, *MYT1*, *PPP2R5B*, *ROR2*) e controle do ciclo celular (*MYT1*) e de reparo a danos no DNA (*RFC2*). O grande número de genes alvos e, conseqüentemente, de vias biológicas

sujeitos à regulação de mir744 sugere a importância dessa sequência e por isso foi considerado um potencial candidato à validação futura.

A perda em 17q12 também envolveu a alteração de genes implicados na regulação do processo apoptótico (*ACCN1*) e resposta inflamatória (genes da família *CCL*). Particularmente, os genes codificadores de quimiocinas (*CCL*) tem um papel importante em doenças inflamatórias incluindo a EDT, atuando diretamente na regulação da resposta imunológica e inflamatória. De fato, um importante *cluster* de genes codificadores de quimiocinas pró-inflamatórias *CCL* está localizado em 17q, especificamente em 17q11.2-q12 (Stefansson et al., 2002). CNVs envolvendo genes codificadores de quimiocinas tem sido comumente investigadas e parece ser resultado de rearranjos complexos em 17q (Stefansson et al., 2002; Cardone et al., 2008).

Foram obtidos dois grupos de alterações genômicas após as análises de agrupamentos não supervisionados nos 18 casos de EDT intestinal. Um achado interessante foi que um agrupamento teve associação estatisticamente significativa com a alteração estrutural característica presente em 22q13.33 ( $P = 0,008$ ). A alteração nesta região está presente em 50% dos casos e foi associada a ganhos nos casos do *cluster 1* (4 casos) e perda nos casos no *cluster 2* (5 casos). Interessantemente, essa região contém grupos de genes com propriedades oncogênicas e supressoras tumorais. Esses achados podem sugerir a existência de rotas diferentes para o desenvolvimento da EDT intestinal. Além disso, a presença de um maior número de alterações no agrupamento 1, quando comparado ao 2, pode ser indicativa de que os ganhos em 22q13.33 contribui para existência de um perfil genômico mais instável nas lesões endometrióides. Possivelmente, o acompanhamento pós-cirúrgico em longo prazo dessas pacientes poderá definir o significado clínico exato desses diferentes perfis de alterações genômicas nas EDTs profundas infiltrativas.

Os experimentos de aCGH geram uma grande quantidade de dados e um dos maiores desafios dessa metodologia corresponde à distinção dos genes com importância funcional para o desenvolvimento da doença estudada. Assim, com a finalidade de identificar moléculas potencialmente envolvidas na EDT, os genes envolvidos em alterações genômicas (ganhos e perdas) foram utilizados para a construção de redes gênicas e análise da participação em vias canônicas com a utilização do *software Ingenuity Pathways Analysis*. Os genes foram também classificados quanto à função molecular e doenças relacionadas.

Nesta análise, a maioria dos genes alterados apresentou funções celulares e moleculares associadas com morfologia, desenvolvimento, sinalização, sobrevivência e movimento celular, apoptose, resposta imunológica (apresentação de antígenos), bem como interação e comunicação célula-célula, as quais foram significativamente correlacionados com ambos os *clusters*. Semelhantes aos nossos achados, outros relatos em literatura, após análise de expressão gênica em larga escala, também demonstraram a associação desses processos celulares na patogênese da EDT (revisado em Zhao et al., 2009).

Os genes alterados em nosso estudo também foram correlacionados com importantes vias canônicas previamente descritas, destacando-se a sinalização de *ILK* (9 genes alterados), a sinalização de quimiocinas (6 genes alterados) e da interleucina 17 (5 genes alterados).

A via de sinalização *ILK* está associada à atividade de proteínas quinases intracelulares cuja principal função é promover a interação entre integrinas e proteínas do citoesqueleto, que são responsáveis pela regulação da adesão e motilidade celular (Tu et al., 2001). Além disso, *ILK* interage com receptores de fatores de crescimento, fatores de transcrição e outras quinases, tendo assim um papel fundamental na integração entre sinais extra e intracelulares relacionados à proliferação, sobrevivência e migração celular,

angiogênese, invasão (Persad e Dedhar, 2003; Friedrich et al., 2004) e regulação da transição epitélio-mesênquima (Grund et al., 2008).

Especificamente na via de *ILK*, nosso estudo demonstrou a alteração dos genes *JNK/MAP2K4* e *P38MAPK/MAPK12*). As proteínas JNK e MAPK12 pertencem à família de quinases MAPKs envolvidas na regulação da proliferação celular, apoptose e resposta inflamatória. Em literatura, dois estudos demonstraram, *in vivo* e *in vitro*, que o aumento de expressão dessas proteínas contribuem igualmente para a progressão da EDT (Yoshino et al., 2004; Uz et al., 2011). Neste estudo, o ganho em *JNK*, contido na região 17p12-p13.1 foi observado em quatro casos do *cluster* 2 (83, 242, 243 e 264), o qual é caracterizado pela perda em 22q13.33, loco onde está mapeado *MAPK12*. Interessantemente, nenhum dos casos do *cluster* 1 (116, 157, 214 e 255) com ganho em 22q13.33, e conseqüentemente de *MAPK12*, apresentaram a alteração em 17p e *JNK*. Esses achados reforçam a hipótese que rotas diferentes atuam na patogênese da EDT intestinal.

Os genes *JNK* e *MAPK12* também foram associados com as outras duas vias canônicas mais relevantes deste estudo. A via de *IL-17* consiste em uma sinalização pró-inflamatória a partir de um complexo protéico heterotrimérico presente na membrana celular formado por três receptores de IL-17. A interleucina 17 é primariamente secretada por linfócitos T e promove o recrutamento de células do sistema imune inato, incluindo neutrófilos, e estimula a produção de defensinas e outros peptídeos de resposta imunológica. Nesta via, os receptores IL-17R ativos estimulam as vias de MAPK (*JNK* e *MAPK12*, e também *MAPK11*) e, conseqüentemente, induzem a produção de outras citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas responsáveis pela resposta inflamatória e o tráfego de células do sistema imunológico, bem como de metaloproteinases, associadas com degradação da matriz extracelular e invasão (Xu e Cao, 2010; Mimeault e Batra, 2010).

A outra via envolve a sinalização de quimionas, um conjunto de citocinas pró-inflamatórias que agem ativando receptores de superfície celular acoplados à proteína G para coordenar diferentes processos celulares, incluindo a produção de outras quimiocinas, CCL4 (ou Mip-1 $\beta$ ) e CCL2 (ou MCP-1). As quimiocinas são comumente secretadas por células T ativas e induzem o recrutamento de monócitos no local da lesão. Níveis aumentados de quimiocinas têm sido relatados no fluído peritoneal (Laudanski et al., 2006) e no sangue periférico (Agic et al., 2008) de pacientes com EDT.

Existe uma questão bastante importante a respeito da origem dessas proteínas pró-inflamatórias na EDT. Alguns estudos têm demonstrado que macrófagos apresentam um papel crucial no desenvolvimento das lesões endometrióides pela produção e secreção de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento, os quais parecem contribuir significativamente para patogênese da doença (Wu et al., 2004). Entretanto, há poucos relatos sobre o papel das células endometrióides na produção dessas proteínas. Ao contrário dos nossos achados que indicam a perda de genes codificadores de CCL, estudos tem relatado que fragmentos de lesões endometrióticas, quando implantados na cavidade pélvica, podem secretar um grande número de quimiocinas para induzir a resposta inflamatória local que irá contribuir para invasão celular e promover a progressão da doença (Dmowski e Braum, 2004; Chen et al., 2010).

Neste estudo, a perda de genes da família CCL foi um achado freqüente e observado em 5/7 casos do *cluster 1* (185, 190, 207, 214 e 255), os quais foram agrupados separadamente daqueles que não mostraram essa alteração (ver Figura 7A). Análises funcionais revelaram que a via das quimionas incluíam ganhos nos genes *JNK* e *MAPK12* sugerindo que rotas biológicas distintas poderiam induzir a resposta inflamatória nas células endometrióides. De fato, a via de sinalização de quimiocinas envolve uma ampla família de proteínas pró-inflamatórias que interagem inespecificamente com receptores acoplados a proteína G (De Ligt et al., 2000). Como

resultado dessa interação não-seletiva, muitos desses receptores são capazes de se ligar a diferentes CCL com alta afinidade. Assim, embora a perda de genes *CCL* seja um achado freqüente neste estudo (incluindo *CCL2/MCP-1*), a via de sinalização das quimiocinas nas lesões endometrióides poderia ser alternativamente ativada por outras quimiocinas ou ainda por *MAPK11* e *MAPK12*. Estas quimiocinas já foram relatadas por Borroni et al. (2010) na ativação da resposta inflamatória.

Foram observadas neste estudo duas principais redes gênicas contendo moléculas associadas às alterações genômicas e apresentando número significativo de interações entre si. Essas duas redes (as quais apresentaram os maiores *scores* de alteração) foram selecionadas para estudo em maior detalhe.

A rede gênica relacionada à motilidade celular/função e desenvolvimento do sistema hematológico/tráfego de células do sistema imunológico (rede 1) revelou alterações em 15 genes, dos quais 8 estavam envolvidos em ganhos e 7 em perdas. Essa rede apresenta um número restrito de genes centrais incluindo *MAP2K4* (interação com 3 genes) e *WNT5A* (2 genes) envolvidos em ganhos, e o *CCL2* (interação com 16 genes) envolvido em perda. A maioria dos genes dessa rede é colateral sendo os principais o *SCO2*, *GAS7*, *MAPK11*, *SBF1*, *TYMP* (ganho), *CCL1*, *CCL7*, *CCL8*, *CCL11* e *CCL13* (perda). É interessante notar que o principal gene dessa rede é o *TNF* (ou fator de necrose tumoral, do inglês *tumoral necrosis factor*), que codifica uma citocina pró-inflamatória multifuncional envolvida na regulação de diferentes processos biológicos incluindo proliferação e diferenciação celular, apoptose e resposta inflamatória. Nessa rede gênica, o *TNF* está interagindo com nove genes alterados (*MAP2K4*, *WNT5A*, *SCO2*, *TYMP*, e *CCL1*, 2, 7, 8 e 11). Alterações em *TNF* e nos genes com que essa citocina interage foram relatados em uma grande variedade de doenças, incluindo o câncer. Na EDT, o *TNF* tem sido implicado principalmente na fosforilação e ativação de *MAP2K4* e *MAPK12* (Yoshino et al., 2004; Uz et al., 2011).

A outra rede gênica alterada está relacionada aos processos de desenvolvimento, crescimento e proliferação celular (rede 2) e mostrou 5 genes envolvidos em ganhos e 1 em perda, os quais localizaram-se exclusivamente nas regiões mais periféricas da rede. Nesta rede, o gene central é o *ER1* ou receptor de estrógeno  $\alpha$ . O ER1 é uma proteína nuclear que atua como um fator de transcrição estrógeno-dependente, regulando a expressão de genes alvos envolvidos em diferentes processos biológicos, incluindo proliferação celular (Cheskis et al., 2007). Na rede gerada em nosso estudo, o ER1 interage diretamente com três genes envolvidos em ganhos, incluindo o *MAPK12*, o qual atua na progressão do ciclo celular. Nas células endometriais, a proliferação celular é estimulada principalmente pela ativação de ER1. Entretanto, há relatos da presença de baixos níveis de expressão de ER1 na EDT peritoneal e ovariana (revisado em Rizner, 2009). Esses achados também foram relatados por Zhao et al. (2009), que realizaram a integração de dados gerados em estudos de expressão gênica em larga escala na EDT. Assim, o potencial proliferativo das células endometrióticas parece estar associado à ativação da via MAPK (Vivacqua et al., 2006; Young, 2008). Somado aos nossos achados, essas evidências sugerem que o caráter proliferativo das células endometrióticas pode também estar associada à ativação da via de MAPKs.

As regiões alteradas detectadas nas lesões endometrióticas intestinais do Grupo II coincidem com a localização de oncogenes e genes supressores tumorais sugerindo um fenótipo semelhante ao observado em tumores humanos. Além disso, a presença de perfis de alterações genômicas distintos observados nesse estudo para o mesmo tipo de lesão pode sugerir a existência de diferentes rotas biológicas envolvidas no desenvolvimento das EDTs intestinais. Por isso, a detecção de regiões cromossômicas alteradas é uma etapa fundamental para o conhecimento da biologia da doença, identificação de genes e de marcadores moleculares.

**Conclusões**



## 6. Conclusões

- Os achados deste estudo permitiram a identificação de alterações genômicas não causais, bem como potenciais genes candidatos relacionados à fisiopatologia da EDT;
- A análise do perfil de alterações genômicas por HR-CGH nas amostras de EDT de diferentes sítios anatômicos (Grupo I) revelou a prevalência de anormalidades comuns entre as lesões, inclusive as provenientes das diferentes lesões da mesma paciente, sugerindo que as EDTs apresentam uma origem comum;
- As alterações genômicas por HR-CGH foram observadas tanto no estroma como no epitélio endometrial das lesões, sugerindo que ambos os componentes celulares participam do desenvolvimento da doença;
- A presença de células CD9<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD117/c-Kit<sup>+</sup> e Oct-4<sup>+</sup> no estroma e/ou epitélio do endométrio tópico e ectópico de pacientes portadoras de EDT indicaram o possível envolvimento das células-tronco endometriais na origem e desenvolvimento da EDT;
- A análise de alterações genômicas globais pela metodologia da aCGH nas EDTs intestinais profundas (Grupo II) revelou um grande número de regiões genômicas envolvidas principalmente em ganhos;
- A análise da aCGH também permitiu a identificação de candidatos relacionados ao desenvolvimento da EDT intestinal profunda, incluindo genes que podem estar associados com o potencial invasivo destas lesões e que podem ser considerados potenciais marcadores diagnósticos e interessantes alvos terapêuticos;

- Pela aCGH, foi possível identificar dois grupos distintos de lesões intestinais profundas quanto ao perfil de alterações genômicas, o qual foi principalmente associado com a alteração em 22q13.33, a qual foi associada a ganhos nos casos do *cluster* 1 e perda nos casos no *cluster* 2, sugerindo a existência de diferentes rotas biológicas envolvidas no desenvolvimento da EDT intestinal profunda;
- A análise da função sugerida das seqüências gênicas com variações no número de cópias nas lesões intestinais profundas revelou o envolvimento de importantes processos celulares, principalmente aqueles relacionados com o desenvolvimento, movimento e sobrevivência celular, bem como sinalização celular;
- Os genes envolvidos em alterações também se correlacionaram com importantes vias canônicas previamente descritas, principalmente as vias de sinalização de *ILK* (*integrin-linked kinase*), quimiocinas e *IL-17*, as quais podem ter um papel fundamental no caráter invasivo e na resposta inflamatória associadas às lesões intestinais profundas;
- As seqüências alteradas nas lesões infiltrativas foram relacionadas a duas principais redes gênicas envolvidas nos processos de proliferação celular e resposta inflamatória mediados pelos genes *ER1* e *TNF*, os quais já foram previamente associados com EDT;
- As análises de alterações genômicas detectadas nos Grupos I e II não foram significativamente associadas com parâmetros clínicos e histopatológicos nas lesões avaliadas.

## Referências Bibliográficas



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrão MS, Gonçalves OM, Dias Jr JA, et al. Comparison between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis. *Human Reproduction* 2007; v22, p3092-7.
- Abrão MS, Ikeda F, Podgaec S, et al. Microlaparoscopy for an intact extopic pregnancy and endometriosis with the use of a diode laser: case report. *Hum Rep* 2000; 15:1369-71.
- Abrão MS, Neme RM, Carvalho FM, et al. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. *Int J Gynecol Obstet* 2003; 82:31–40.
- Agic A, Djalali S, Wolfler MM, et al. Combination of CCR1 mRNA, MCP1, and CA125 measurements in peripheral blood as a diagnostic test for endometriosis. *Reprod Sci* 2008;15:906-11.
- Aldred MA, Morrison C, Gimm O, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is frequently downregulated in a diversity of sporadic nonmedullary thyroid carcinomas. *Oncogene* 2003; 22(22):3412-6.
- Ambrosio EP, Rosa FE, Domingues MA, et al. Cortactin is associated with perineural invasion in the deep invasive front area of laryngeal carcinomas. *Hum Pathol* 2010 (*in press*).
- American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997; 67:817-21.
- Arnold JT, Kaufman DG, Seppälä M, et al. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Hum Rep* 2001; 16:836-45.
- Arya P, Shaw R. Endometriosis: Current thinking. *Curr Obstet Gynaecol* 2005; 15:191-8.
- Baldi A, Campioni M, Signorile PG. Endometriosis: pathogenesis, diagnosis, therapy and association with cancer (review). *Oncol Rep* 2008; 19:843-6.
- Bandiera S, Hatem E, Lyonnet S, et al. MicroRNAs in diseases: from candidate to modifier genes. *Clin Genet* 2010; 77(4):306-13.
- Banz C, Ungethuem U, Kuban RJ, et al. The molecular signature of endometriosis-associated endometrioid ovarian cancer differs significantly from endometriosis-independent endometrioid ovarian cancer. *Fertil Steril* 2009; 94(4):1212-7.

- Barcellos-Hoff MH, Medina D. New highlights on stroma-epithelial interactions in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005; 7:33-6.
- Barlow DH, Kennedy S. Endometriosis: new genetic approaches and therapy. *Annu Rev Med* 2005; 56:345-56.
- Beckmann JS, Estivill X, Antonarakis SE. Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nat Rev Genet* 2007; 8:639-46.
- Béliard A, Donnez J, Nisolle M, et al. Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 67(2):266-72.
- Belicchi M, Pisati F, Lopa R, et al. Human skin-derived stem cells migrate throughout forebrain and differentiate into astrocytes after injection into adult mouse brain. *J Neurosci Res* 2004; 77(4):475-86.
- Benoit L, Arnould L, Cheynel N, et al. Malignant extraovarian endometriosis: a review. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32:6-11.
- Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004; 432:332-7.
- Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B. The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med* 2008; 86(9):1025-32.
- Bischoff FZ, Simpson JL. Heritability and molecular genetic studies of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2000; 6:37-44.
- Blons H, Laccourreye O, Houllier AM, et al. Delineation and candidate gene mutation screening of the 18q22 minimal region of deletion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2002; 21:5016-23.
- Borroni EM, Mantovani A, Locati M, Bonecchi R. Chemokine receptors intracellular trafficking. *Pharmacol Ther* 2010; 127:1-8.
- Bouquet de Jolinière J, Validire P, Canis M, et al. Human endometriosis-derived permanent cell line (FbEM-1): establishment and characterization. *Hum Reprod Update* 1997; 3:117-23.
- Braude I, Vukovic B, Prasad M, et al. Large scale copy number variation (CNV) at 14q12 is associated with the presence of genomic abnormalities in neoplasia. *BMC Genomics* 2006; 7:138.

- Braun DP, Dmowski WP. Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998; 10(5):365-9.
- Bricou A, Batt RE, Chapron C. Peritoneal fluid flow influences anatomical distribution of endometriotic lesions: why Sampson seems to be right. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 138:127-34.
- Brinton LA, Gridley G, Persson I, et al. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:572-9.
- Brosens I, Puttemans P, Campo R, et al. Diagnosis of endometriosis: pelvic endoscopy and imaging techniques. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18:285-303.
- Bulun SE, Cheng YH, Pavone ME, et al. Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis. *Semin Reprod Med* 2010; 28(1):36-43.
- Bulun SE, Yang S, Fang Z, et al. Estrogen Production and Metabolism in Endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955:75-85.
- Cakmak H, Taylor HS. Molecular mechanisms of treatment resistance in endometriosis: the role of progesterone-hox gene interactions. *Semin Reprod Med* 2010; 28(1):69-74.
- Califano JA, Johns MM 3rd, Westra WH, et al. An allelotype of papillary thyroid cancer. *Int J Cancer* 1996; 69:442-4.
- Campbell IG, Foulkes WD, Beynon G, et al. LOH and mutation analysis of CDKN2 in primary human ovarian cancers. *Int J Cancer* 1995; 63:222-5.
- Campbell IG, Thomas EJ. Endometriosis: candidate genes. *Hum Reprod Update* 2001; 7:15-20.
- Cardone MF, Jiang Z, D'Addabbo P, et al. Hominoid chromosomal rearrangements on 17q map to complex regions of segmental duplication. *Genome Biol* 2008; 9:R28.
- Carvalho FM, Abrao MS. Histopatologia da endometriose: a importância da interação ginecologista e patologista. In: Abrao MS, editor. *Endometriose: uma abordagem contemporânea*. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. p. 35 –44.
- Cavallaro U, Liebner S, Dejana E. Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312:659-67.
- Chan RW, Gargett CE. Identification of label-retaining cells in mouse endometrium. *Stem Cells* 2006; 24(6):1529-38.
- Chan RWS, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod* 2004; 70:1738-50.

- Chapron C, Chopin N, Borghese B, Foulot et al. Deeply infiltrating endometriosis: pathogenetic implications of the anatomical distribution. *Hum Reprod* 2006; 21:1839-45.
- Chapron C, Dubuisson JB, Chopin N, et al. Deep pelvic endometriosis: management and proposal for a "surgical classification". *Gynecol Obstet Fertil* 2003; 31:197-206.
- Chen QH, Zhou WD, Su ZY, Huang QS, Jiang JN, Chen QX. Change of proinflammatory cytokines follows certain patterns after induction of endometriosis in a mouse model. *Fertil Steril* 2010; 93:1448-54.
- Chen Y, Chen PL, Chen CF, et al. Never-in-mitosis related kinase 1 functions in DNA damage response and checkpoint control. *Cell Cycle* 2008; 7(20):3194-201.
- Cheng L, Nagabhushan M, Pretlow TP, et al. Expression of E-cadherin in primary and metastatic prostate cancer. *Am J Pathol* 1996; 148:1375-80.
- Cheskis BJ, Greger JG, Nagpal S, et al. Signaling by estrogens. *J Cell Physiol* 2007; 213(3):610-7.
- Cheung AN, Tin VP, Ngan HY, et al. Interphase cytogenetic study of endometrial stromal sarcoma by chromosome in situ hybridization. *Mod Pathol* 1996; 9:910-8.
- Cho NH, Park YK, Kim YT, et al. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil Steril* 2004; 81:403-7.
- Clark ES, Brown B, Whigham AS, et al. Aggressiveness of HNSCC tumors depends on expression levels of cortactin, a gene in the 11q13 amplicon. *Oncogene* 2009; 28:431-44.
- Clement PB, Seidman JD, Russell P, et al. Diseases of the peritoneum. In: Kurman RJ, ed. *Blaustein's pathology of the female genital tract*. 5th ed. New York: Springer 2002; p746–68, p791–905.
- Cody NA, Ouellet V, Manderson EN, et al. Transfer of chromosome 3 fragments suppresses tumorigenicity of an ovarian cancer cell line monoallelic for chromosome 3p. *Oncogene* 2007; 26:618-32.
- Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, et al. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril* 1990; 53:978-83.
- Coudry RA, Meireles SI, Stoyanova R, et al. Successful application of microarray technology to microdissected formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn* 2007; 9:70-9.
- Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009; 10(10):704-14.
- Darai E, Thomassin I, Barranger E, et al. Feasibility and clinical outcome of laparoscopic colorectal resection for endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192:392-400.

- Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation>). In: Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 2004; 36(9):949-51.
- De Leeuw WJ, Berx G, Vos CB, et al. Simultaneous loss of E-cadherin and catenins in invasive lobular breast cancer and lobular carcinoma in situ. *J Pathol* 1997; 183:404-11.
- de Ligt RA, Kourounakis AP, Ijzerman AP. Inverse agonism at G protein-coupled receptors: (patho)physiological relevance and implications for drug discovery. *Br J Pharmacol* 2000; 130:1-12.
- de Smith AJ, Walters RG, Froguel P, et al. Human genes involved in copy number variation: mechanisms of origin, functional effects and implications for disease. *Cytogenet Genome Res* 2008; 123:17-26.
- Deckers M, van Dinther M, Buijs J, et al. The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66:2202-9.
- Di Matteo P, Arrigoni GL, Alberici L, et al. Enhanced expression of CD13 in vessels of inflammatory and neoplastic tissues. *J Histochem Cytochem* 2011; 59(1):47-59.
- Dias Jr JA, Podgaec S, Abrão MS. Atlas de Cirurgia Ginecológica: Endometriose Peritoneal e Ovariana. Editor: Prof. Dr. Mauricio Simões Abrão, 1ª Edição. - São Paulo : PlanMark 2006; p4-14.
- Dmowski WP, Braun DP. Immunology of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gyn* 2004; 18:245-63.
- Dogan S, Machicao F, Wallwiener D, et al. Association of peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 Pro-12-Ala polymorphism with endometriosis. *Fertil Steril* 2004; 81(5):1411-3.
- Dong S, Pang JC, Hu J, et al. Transcriptional inactivation of TP73 expression in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 2002; 98:370-5.
- Druckmann R, Rohr UD. IGF-1 in gynaecology and obstetrics: update 2002. *Maturitas* 2002; 1:S65-83.
- Du Z, Cong H, Yao Z. Identification of putative downstream genes of Oct-4 by suppression-subtractive hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282(3):701-6.
- Erzen M, Rakar S, Klancnik B, et al. Endometriosis-associated ovarian carcinoma (EAOC): an entity distinct from other ovarian carcinomas as suggested by a nested case-control study. *Gynecol Oncol* 2001; 83:100-8.

- Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997; 24:235-58.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:259-69.
- Esteller M. Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clin Immunol* 2003; 109:80-8.
- Estivill X, Armengol L. Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. *PLOS Genetics* 2007; 3:1787-99.
- Eyster KM, Klinkova O, Kennedy V, et al. Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrium. *Fertil Steril* 2007; 88:1505-33.
- Falchi M, Bataille V, Hayward NK, et al. Genome-wide association study identifies variants at 9p21 and 22q13 associated with development of cutaneous nevi. *Nat Genet* 2009; 41:915-9.
- Farquhar CM. Extracts from the "clinical evidence". *Endometriosis. BMJ* 2000; 320:1449-52.
- Fauconnier A, Chapron C. Endometriosis and pelvic pain: epidemiological evidence of the relationship and implications. *Hum Reprod Update* 2005; 11(6):595-606.
- Figueira PG, Abrão MS, Krikun G, et al. Stem cells in endometrium and their role in the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1221:10-7.
- Flores I, Rivera E, Ruiz LA, et al. Molecular profiling of experimental endometriosis identified gene expression patterns in common with human disease. *Fertil Steril* 2007; 87:1180-99.
- Forte A, Schettino MT, Finicelli M, et al. Expression pattern of stemness-related genes in human endometrial and endometriotic tissues. *Mol Med* 2009; 15(11-12):392-401.
- Fraser IS. Low-dose mifepristone: Effects on the endometrium. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2009; 49:77-83.
- Fraser IS. Recognising, understanding and managing endometriosis. *J Hum Rep Sci* 2008; 1:56-64.
- Friedrich EB, Liu E, Sinha S, et al. Integrin-linked kinase regulates endothelial cell survival and vascular development. *Mol Cell Biol* 2004; 24(18):8134-44.
- Fukunaga M, Nomura K, Ishikawa E, et al. Ovarian atypical endometriosis: its close association with malignant epithelial tumors. *Histopathology* 1997; 30:249-55.

- Gaetje R, Holtrich U, Karn T, et al. Characterization of WNT7A expression in human endometrium and endometriotic lesions. *Fertil Steril* 2007; 88:1534-40.
- Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, Baumann R, et al. Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. *Am J Pathol* 1997; 150:461–7.
- Gargett CE, Chan RWS, Schwab KE. Endometrial stem cells. *Curr Op Obstret Gynecol* 2007; 19:377-83.
- Gargett CE, Chan RWS, Schwab KE. Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: Role of stem/progenitor cells. *Mol Cel End* 2008; 288:22-9.
- Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, et al. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod* 2009; 80(6):1136-45.
- Gargett CE. Identification and characterisation of human endometrial stem/progenitor cells. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006; 46(3):250-3.
- Gargett CE. Uterine stem cells: What is the evidence? *Hum Reprod Update* 2007; 13:87–101.
- Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1796(2):293-308.
- Girnun GD, Smith WM, Drori S, et al. APC-dependent suppression of colon carcinogenesis by PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:13771-6.
- Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004; 364:1789-99.
- Giudice LC. Clinical Practice. Endometriosis. *N Engl J Med* 2010; 362: 2389-98.
- Giudice LC. Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med* 2010; 362:2389-98.
- Gogusev J, Bouquet de Jolinière J, Telvi L, et al. Detection of DNA copy number changes in human endometriosis by comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 1999; 105:444-51.
- Gogusev J, Bouquet de Jolinière J, Telvi L, et al. Genetic abnormalities detected by comparative genomic hybridization in a human endometriosis-derived cell line. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:821-7.
- Goumenou AG, Arvanitis DA, Matalliotakis IM, et al. Microsatellite DNA assays reveal an allelic imbalance in p16(Ink4), GALT, p53, and APOA2 loci in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 75:160-5.

- Goumenou AG, Matalliotakis IM, Tzardi M, et al. p16, retinoblastoma (pRb), and cyclin D1 protein expression in human endometriotic and adenomyotic lesions. *Fertil Steril* 2006; 1:1204-7.
- Grady WM. Transforming growth factor-beta, Smads, and cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11:3151-4.
- Griffith JS, Rodgers AK, Schenken RS. In Vitro Models to Study the Pathogenesis of Endometriosis. *Reprod Sci* 2010; 17(1):5-12.
- Grund EM, Kagan D, Tran CA, Zeitvogel A, Starzinski-Powitz A, Nataraja S, Palmer SS. Tumor necrosis factor-alpha regulates inflammatory and mesenchymal responses via mitogen-activated protein kinase kinase, p38, and nuclear factor kappaB in human endometriotic epithelial cells. *Mol Pharmacol* 2008;73:1394-404.
- Guan XY, Fang Y, Sham JS, et al. Recurrent chromosome alterations in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 29:110-6.
- Gunn SR, Robetorye RS, Mohammed MS. Comparative genomic hybridization arrays in clinical pathology: progress and challenges. *Mol Diagn Ther* 2007; 11:73-7.
- Guo SW, Wu Y, Strawn E, et al. Genomic alterations in the endometrium may be a proximate cause for endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 116:89-99.
- Ha SA, Kim HK, Yoo J, et al. Transdifferentiation-inducing HCCR-1 oncogene. *BMC Cell Biol* 2010; 11:49.
- Hahn SA, Bartsch D, Schroers A, et al. Mutations of the DPC4/Smad4 gene in biliary tract carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58(6):1124-6.
- Hansen KA, Eyster KM. Genetics and genomics of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 2010; 53:403-12.
- Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, et al. Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet* 2009; 10:551-64.
- Hermansen SK, Christensen KG, Jensen SS, et al. Inconsistent immunohistochemical expression patterns of four different CD133 antibody clones in glioblastoma. *J Histochem Cytochem* 2011; 59(4):391-407.
- Hitti IF, Glasberg SS, Lubicz S. Clear cell carcinoma arising in extraovarian endometriosis: report of three cases and review of the literature. *Gynecol Oncol* 1990; 39:314-20.
- Holzmann K, Kohlhammer H, Schwaenen C, et al. Genomic DNA-chip hybridization reveals a higher incidence of genomic amplifications in pancreatic cancer than conventional comparative

- genomic hybridization and leads to the identification of novel candidate genes. *Cancer Res* 2004; 64:4428-33.
- Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, et al. Polymorphism for transforming growth factor beta 1-509 (TGF-B1-509): association with endometriosis. *Biochem Genet* 2005; 43:203-10.
- Hsu AL, Khachikyan I, Stratton P. Invasive and noninvasive methods for the diagnosis of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 2010; 53:413-9.
- Hui AB, Or YY, Takano H, et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis identified cyclin D1 as a target oncogene at 11q13.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65:8125-33.
- Hwang KR, Choi YM, Kim JM, et al. Association of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 Pro12Ala polymorphism with advanced-stage endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2010; 64(5):333-8.
- Inan S, Kescu NK, Vatansever S, et al. Increased vascular surface density in ovarian endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2003; 17(2):143-50.
- Jenkins S, Olive DL, Haney AF. Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol* 1986; 67:335-8.
- Jiang X, Hitchcock A, Bryan EJ, et al. Microsatellite analysis of endometriosis reveals loss of heterozygosity at candidate ovarian tumor suppressor gene loci. *Cancer Res* 1996; 56:3534-9.
- Jiang X, Morland SJ, Hitchcock A, et al. Allelotyping of endometriosis with adjacent ovarian carcinoma reveals evidence of a common lineage. *Cancer Res* 1998; 58(8):1707-12.
- Jimbo H, Hitomi Y, Yoshikawa H, et al. Evidence for monoclonal expansion of epithelial cells in ovarian endometrial cysts. *Am J Pathol* 1997; 150:1173-8.
- Johnson MC, Torres M, Alves A, et al. Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3:45.
- Jones KD, Owen E, Berresford A, et al. Endometrial adenocarcinoma arising from endometriosis of the rectosigmoid colon. *Gynecol Oncol* 2002; 86:220-2.
- Jones TD, Wang M, Eble JN, et al. Molecular evidence supporting field effect in urothelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2005; 11:6512-9.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258:818-21.

- Kamergorodsky G, Ayroza Ribeiro PA, Longo Galvão MA, et al. Histologic classification of specimens from women affected by superficial endometriosis, deeply infiltrating endometriosis, and ovarian endometriomas. *Fertil Steril* 2009; 92(6):2074-7.
- Kao LC, Germeyer A, Tulac S, et al. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 2003; 144:2870-81.
- Kato K, Yoshimoto M, Kato K, et al. Characterization of side-population cells in human normal endometrium. *Hum Reprod* 2007; 22(5):1214-23.
- Kavoussi SK, Witz CA, Binkley PA, et al. Peroxisome-proliferator activator receptor-gamma activation decreases attachment of endometrial cells to peritoneal mesothelial cells in an in vitro model of the early endometriotic lesion. *Mol Hum Reprod* 2009; 15(10):687-92.
- Kennedy S, Bennett S, Weeks DE. Affected sib-pair analysis in endometriosis. *Hum Reprod Update* 2001; 7:411-8.
- Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 20:2698-704.
- Kennedy S, Hadfield R, Westbrook C, et al. Magnetic resonance imaging to assess familial risk in relatives of women with endometriosis. *Lancet* 1998; 352:1440-1.
- Kim J, Kim J, Kim DW, et al. Wnt5a induces endothelial inflammation via beta-catenin-independent signaling. *J Immunol* 2010; 185(2):1274-82.
- Kim K, Park BH, Ihm H, et al. Expression of stem cell marker CD133 in fetal and adult human kidneys and pauci-immune crescentic glomerulonephritis. *Histol Histopathol* 2011; 26(2):223-32.
- Kim KH, Choi JS, Kim JM, et al. Enhanced CD24 expression in endometrial carcinoma and its expression pattern in normal and hyperplastic endometrium. *Histol Histopathol* 2009; 24(3):309-16.
- Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, et al. Automatic correction of the interfering effect of unsuppressed interspersed repetitive sequences in comparative genomic hybridization analysis. *Cytometry* 1997; 28:130-4.

- Kirchhoff M, Gerdes T, Rose H, et al. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry* 1998; 31:163-73.
- Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 2001; 38:740-4.
- Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, et al. Oestrogen receptor-alpha gene polymorphism is associated with endometriosis, adenomyosis and leiomyomata. *Hum Reprod* 2001; 16:51-5.
- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, et al. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:4494-9.
- Kobayashi H, Kajiwara H, Kanayama S, et al. Molecular pathogenesis of endometriosis-associated clear cell carcinoma of the ovary (Review). *Oncol Rep* 2009; 22:233-40.
- Kobayashi H, Sumimoto K, Moniwa N, et al. Risk of developing ovarian cancer among women with ovarian endometrioma: a cohort study in Shizuoka, Japan. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17:37-43.
- Konno R, Fujiwara H, Netsu S, et al. Gene expression profiling of the rat endometriosis model. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:330-43.
- Kristiansen G, Denkert C, Schlüns K, et al. CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival. *Am J Pathol* 2002; 161(4):1215-21.
- La Grenade A, Silverberg S. Ovarian tumors associated with atypical endometriosis. *Hum Pathol* 1988; 19(9):1080-4.
- Larramendy ML, Lushnikova T, Björkqvist AM, et al. Comparative genomic hybridization reveals complex genetic changes in primary breast cancer tumors and their cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 119(2):132-8.
- Lattuada D, Somigliana E, Viganò P, et al. Genetics of endometriosis: a role for the progesterone receptor gene polymorphism PROGINS? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 61(2):190-4.
- Laudanski P, Szamatowicz J, Kowalczyk O, et al. Expression of selected tumor suppressor and oncogenes in endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* 2009; 24:1880-90.

- Laudański P, Szamatowicz J, Oniszcuk M. Profiling of peritoneal fluid of women with endometriosis by chemokine protein array. *Adv Med Sci* 2006; 51:148-52.
- Lebovic DI, Chao VA, Martini JF, et al. IL-1beta induction of RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) chemokine gene expression in endometriotic stromal cells depends on a nuclear factor-kappaB site in the proximal promoter. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4759-64.
- Lebovic DI, Mwenda JM, Chai DC, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-(gamma) receptor ligand partially prevents the development of endometrial explants in baboons: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Endocrinology* 2010; 151(4):1846-52.
- Lebovic DI, Mwenda JM, Chai DC, et al. PPAR-gamma receptor ligand induces regression of endometrial explants in baboons: a prospective, randomized, placebo- and drug-controlled study. *Fertil Steril* 2007; 88(4 Suppl):1108-19.
- Lee AK, Wiley B, Dugan JM, et al. Quantitative DNA analysis and proliferation in breast carcinomas. A comparison between image analysis and flow cytometry. *Pathol Res Pract* 1992; 188:428-32.
- Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet* 2007; 39(7 Suppl):S48-54.
- Levy A. Monoclonality of endocrine tumours: What does it mean? *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12(7):301-7.
- Leyendecker G, Herbertz M, Kunz G, et al. Endometriosis results from the dislocation of basal endometrium. *Hum Reprod* 2002; 17:2725–36.
- Li L, Yu C, Gao H, et al. Argonaute proteins: potential biomarkers for human colon cancer. *BMC Cancer* 2010; 10:38-46.
- Liberti SE, Rasmussen LJ. Is hEXO1 a cancer predisposing gene? *Mol Cancer Res* 2004; 2:427-32.
- Lim SC, Oh SH. The role of CD24 in various human epithelial neoplasias. *Pathol Res Pract* 2005; 201:479–86.
- Ljuslinder I, Malmer B, Golovleva I, et al. Increased copy number at 3p14 in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005; 7(5):R719-27.
- Lushnikova T, Knuutila S, Miettinen M. DNA copy number changes in epithelioid sarcoma and its variants: a comparative genomic hybridization study. *Mod Pathol* 2000; 13:1092-6.
- Lynch L, Golden-Mason L, Eogan M, et al. Cells with haematopoietic stem cell phenotype in adult human endometrium: relevance to infertility? *Hum Reprod* 2007; 22:919–26.

- Malinak LR, Buttram VC Jr, Elias S, et al. Heritage aspects of endometriosis. II. Clinical characteristics of familial endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137:332-7.
- Mandai M, Yamaguchi K, Matsumura N, et al. Ovarian cancer in endometriosis: molecular biology, pathology, and clinical management. *Int J Clin Oncol* 2009; 14(5):383-91.
- Maruyama T, Masuda H, Ono M, et al. Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology. *Reproduction* 2010; 140(1):11-22.
- Matsuzaki S, Canis M, Pouly JL, et al. Differential expression of genes in eutopic and ectopic endometrium from patients with ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 2006; 86:548-53.
- Matsuzaki S, Canis M, Vaur-Barrière C, et al. DNA microarray analysis of gene expression in eutopic endometrium from patients with deep endometriosis using laser capture microdissection. *Fertil Steril* 2005; 84 (Suppl 2):1180-90.
- Matsuzaki S, Canis M, Vaur-Barrière C, et al. DNA microarray analysis of gene expression profiles in deep endometriosis using laser capture microdissection. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:719-28.
- Matsuzaki S, Murakami T, Uehara S, et al. Expression of estrogen receptor alpha and beta in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 75:1198-205.
- Matthai C, Horvat R, Noe M, et al. Oct-4 expression in human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2006; 12:7-10.
- Mayr D, Amann G, Siefert C, et al. Does endometriosis really have premalignant potential? A clonal analysis of laser-microdissected tissue. *FASEB J* 2003; 17(6):693-5.
- McCarroll SA, Kuruvilla FG, Korn JM, et al. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat Genet* 2008; 40:1166-74.
- Meng X, Ichim TE, Zhong J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med* 2007; 5:57.
- Mhawech P, Kinkel K, Vlastos G, et al. Ovarian carcinomas in endometriosis: an immunohistochemical and comparative genomic hybridization study. *Int J Gynecol Pathol* 2002; 21:401-6.
- Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, et al. Overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 67:61-70.
- Mills RE, Walter K, Stewart C, et al. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature* 2011; 470:59-65.

- Mimeault M, Batra SK. New advances on critical implications of tumor- and metastasis-initiating cells in cancer progression, treatment resistance and disease recurrence. *Histol Histopathol* 2010; 25:1057-73.
- Missmer SA, Cramer DW. The epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2003; 30:1-19.
- Modesitt SC, Tortolero-Luna G, Robinson JB, et al. Ovarian and extraovarian endometriosis-associated cancer. *Obstet Gynecol* 2002; 100:788-95.
- Mommers EC, van Diest PJ, Leonhart AM, et al. Expression of proliferation and apoptosis-related proteins in usual ductal hyperplasia of the breast. *Hum Pathol* 1998; 29:1539-45.
- Montgomery GW, Nyholt DR, Zhao ZZ, et al. The search for genes contributing to endometriosis risk. *Hum Reprod Update* 2008; 14:447-57.
- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960; 20:613-6.
- Mulac-Jericevic B, Conneely OM. Reproductive tissue-selective actions of progesterone receptors. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2005; (52):19-37.
- Nabeshima H, Murakami T, Yoshinaga K, et al. Analysis of the clonality of ectopic glands in peritoneal endometriosis using laser microdissection. *Fertil Steril* 2003; 80(5):1144-50.
- Nair AS, Nair HB, Lucidi RS, et al. Modeling the early endometriotic lesion: mesothelium-endometrial cell co-culture increases endometrial invasion and alters mesothelial and endometrial genetranscription. *Fertil Steril* 2008; 90:1487-95.
- Nakamura M, Kyo S, Zhang B, et al. Prognostic impact of CD133 expression as a tumor-initiating cell marker in endometrial cancer. *Hum Pathol* 2010; 41(11):1516-29.
- Nakashima R, Fujita M, Enomoto T, et al. Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumours. *Br J Cancer* 1999; 80:458-67.
- Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, et al. Pathogenesis of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18:233-44.
- Nasu K, Yuge A, Tsuno A, et al. Involvement of resistance to apoptosis in the pathogenesis of endometriosis. *Histol Histopathol* 2009; 24:1181-92.

- Natsugoe S, Xiangming C, Matsumoto M, et al. Smad4 and transforming growth factor beta1 expression in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* 2002; 8:1838-42.
- NCBI - National Center for Biotechnology Information – (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/OMIN>). Acessado em março/2011.
- Nezhat F, Cohen C, Rahaman J, et al. Comparative immunohistochemical studies of bcl-2 and p53 proteins in benign and malignant ovarian endometriotic cysts. *Cancer* 2002; 94:2935-40.
- Nezhat F, Datta MS, Hanson V, et al. The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review. *Fertil Steril* 2008; 90:1559-70.
- Nilbert M, Pejovic T, Mandahl N, et al. Monoclonal origin of endometriotic cysts. *Int J Gynecol Cancer* 1995; 5(1):61-3.
- Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997; 68:585-96.
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194:23-8.
- Ogawa S, Kaku T, Amada S, et al. Ovarian endometriosis associated with ovarian carcinoma: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* 2000; 77:298-304.
- Ohama Y, Harada T, Iwabe T, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand reduced tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production and growth in endometriotic stromal cells. *Fertil Steril* 2008; 89(2):311-7.
- Ohlsson Teague EM, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, et al. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol* 2009; 23:265-75.
- Omwandho CO, Konrad L, Halis G, et al. Role of TGF-betas in normal human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod* 2010; 25(1):101-9.
- Oral E, Ilvan S, Tustas E, et al. Prevalence of endometriosis in malignant epithelial ovary tumours. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 109:97-101.
- Osuga Y, Koga K, Tsutsumi O, et al. Stem cell factor (SCF) concentrations in peritoneal fluid of women with or without endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44(4):231-5.
- Pacchiarotti A, Caserta D, Sbracia M, et al. Expression of oct-4 and c-kit antigens in endometriosis. *Fertil Steril* 2011; 95(3):1171-3.

- Painter JN, Anderson CA, Nyholt DR, et al. Genome-wide association study identifies a locus at 7p15.2 associated with endometriosis. *Nat Genet* 2011; 43(1):51-4.
- Paiva CE, Drigo SA, Rosa FE, et al. Absence of transforming growth factor- $\beta$  type II receptor is associated with poorer prognosis in HER2-negative breast tumours. *Ann Oncol* 2010; 21(4):734-40.
- Paksoy M, Karabiçak I, Ayan F, et al. Intestinal obstruction due to rectal endometriosis. *Mt Sinai J Med* 2005; 405-8.
- Park KR, Inoue T, Ueda M, et al. CD9 is expressed on human endometrial epithelial cells in association with integrins  $\alpha 6$ ,  $\alpha 3$  and  $\beta 1$ . *Mol Human Reprod* 2000; 6:252-7.
- Peiffer SL, Herzog TJ, Tribune DJ, et al. Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer Res* 1995; 55:1922-6.
- Pelch KE, Schroder AL, Kimball PA, et al. Aberrant gene expression profile in a mouse model of endometriosis mirrors that observed in women. *Fertil Steril* 2010; 93(5):1615-27.
- Pereira CM, de Abreu Alves F, Corrêa ME, et al. Mouth metastasis of peripheral primitive neuroectodermal tumor. *Oral Dis* 2005; 11:44-5.
- Pérez R, Melero R, Balboa MA, et al. Role of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 2004; 279:40385-91.
- Persad S, Dedhar S. The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22:375-84.
- Pimentel-Muiños FX, Seed B. Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. *Immunity* 1999; 11:783-93.
- Pimentel-Muiños FX, Seed B. Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. *Immunity* 1999; 11(6):783-93.
- Pires ARC, Andreiuolo FM, de Souza SR. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built-needles. *Diag Pathol* 2006; 1:14-8.
- Podgaec S, Abrao MS, Dias JA Jr, et al. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod* 2007; 22(5):1373-9.

- Poncelet C, Leblanc M, Walker-Combrouze F, et al. Expression of cadherins and CD44 isoforms in human endometrium and peritoneal endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81:195–203.
- Prowse AH, Manek S, Varma R, et al. Molecular genetic evidence that endometriosis is a precursor of ovarian cancer. *Int J Cancer* 2006; 119:556-62.
- Ramón LA, Braza-Boïls A, Gilabert-Estellés J, et al. microRNAs expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors. *Hum Reprod* 2011; 26:1082-90.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444:444-54.
- Reinacher-Schick A, Baldus SE, Romdhana B, et al. Loss of Smad4 correlates with loss of the invasion suppressor E-cadherin in advanced colorectal carcinomas. *J Pathol* 2004; 202:412-20.
- Reis FM, Luisi S, Carneiro MM, et al. Activin, inhibin and the human breast. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 225:77-82.
- Revel A. Multitasking human endometrium: a review of endometrial biopsy as a diagnostic tool, therapeutic applications, and a source of adult stem cells. *Obstet Gynecol Surv* 2009; 4:249-57.
- Rizner TL. Estrogen metabolism and action in endometriosis. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 307:8-18.
- Robboy SJ, Bean SM. Pathogenesis of endometriosis. *Reprod Biomed Online* 2010; 21(1):4-5.
- Rogatto SR. Citogenética sem risco: biossegurança e garantia de qualidade. 1ª ed. FUNPEC. Ribeirão Preto-SP, 170t, 2000.
- Rutella S, Bonanno G, Procoli A, et al. Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors. *Clin Cancer Res* 2009; 15(13):4299-311.
- Rutgers JL, Scully RE. Ovarian mixed-epithelial papillary cystadenomas of borderline malignancy of mullerian type. A clinicopathologic analysis. *Cancer* 1988; 61:546-54.
- Sagsveen M, Farmer JE, Prentice A, et al. Gonadotrophin-releasing hormone analogues for endometriosis: bone mineral density. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; (4):CD001297.
- Sampson J. Endometrial carcinoma of the ovary, arising in endometrial tissue of that organ. *Arch Surg* 1925; 10:1-72.

- Santin AD, Zhan F, Bellone S, et al. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int J Cancer* 2004; 112(1):14-25.
- Sasaki CY, Lin H, Morin PJ, et al. Truncation of the extracellular region abrogates cell contact but retains the growth-suppressive activity of E-cadherin. *Cancer Res* 2000; 60:7057-65.
- Sasaki H, Tanahashi M, Yukiue H, et al. Decreased peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression was correlated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2002; 36:71-6.
- Sasson IE, Taylor HS. Stem Cells and the Pathogenesis of Endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1127:106-15.
- Savas S. Useful genetic variation databases for oncologists investigating the genetic basis of variable treatment response and survival in cancer. *Acta Oncol* 2010; 49:1217-26.
- Schoumans J, Nielsen K, Jeppesen I, et al. A comparison of different metaphase CGH methods for the detection of cryptic chromosome aberrations of defined size. *Eur J Hum Genet* 2004; 12:447-54.
- Schwab KE, Chan RWS, Gargett CE. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil Steril* 2005; 84(2):1124-9.
- Schwab KE, Hutchinson P, Gargett CE. Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. *Hum Reprod* 2008; 23(4):934-43.
- Scotti S, Regidor PA, Schindler AE, et al. Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:610-7.
- Seli E, Senturk L, Bahtiyar OM, et al. Expression of aminopeptidase N in human endometrium and regulation of its activity by estrogen. *Fertil Steril* 2001; 75:1172-6.
- Sha G, Wu D, Zhang L, et al. Differentially expressed genes in human endometrial endothelial cells derived from eutopic endometrium of patients with endometriosis compared with those from patients without endometriosis. *Hum Reprod* 2007; 22:3159-69.
- Sharma I, Dhawan V, Saha SC, et al. In vitro effects of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  ligands on gene expression in lipopolysaccharide-induced endometrial and endometriotic stromal cells. *Fertil Steril* 2011; 95(2):829-31.e1-5.

- Sherwin R, Catalano R, Sharkey A. Large-scale gene expression studies of the endometrium: what have we learnt? *Reproduction* 2006; 132:1–10.
- Shiozawa T, Nikaido T, Shimizu M, et al. Immunohistochemical analysis of the expression of cdk4 and p16INK4 in human endometrioid-type endometrial carcinoma. *Cancer* 1997; 80:2250-6.
- Shivapurkar N, Sood S, Wistuba II, et al. Multiple regions of chromosome 4 demonstrating allelic losses in breast carcinomas. *Cancer Res* 1999a; 59:3576-80.
- Shivapurkar N, Virmani AK, Wistuba II, et al. Deletions of chromosome 4 at multiple sites are frequent in malignant mesothelioma and small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999b; 5:17-23.
- Shlien A, Malkin D. Copy number variations and cancer susceptibility. *Curr Opin Oncol* 2010; 22:55-63.
- Silveira CG, Oliveira FM, Valera ET, et al. New recurrent deletions in the PPARgamma and TP53 genes are associated with childhood myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2009b; 33:19-27.
- Silveira CGT, Rogatto SR, Podgaec S, et al. Recent advances in molecular genetics of endometriosis 2009a; 1:9-18.
- Simpson JL, Elias S, Malinak LR, et al. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137:327-31.
- Siristatidis C, Nissotakis C, Chrelas C, et al. Immunological factors and their role in the genesis and development of endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res* 2006; 32:162-70.
- Siristatidis CS. What have the 'omics done for endometriosis? *Med Sci Monit* 2009; 15:RA116-23.
- Slavin RE, Krum R, van Dinh T. Endometriosis-associated intestinal tumors: a clinical and study of 6 cases with review of the literature. *Hum Pathol* 2000; 31:456-63.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20:399-407.
- Somigliana E, Viganò P, Parazzini F, et al. Association between endometriosis and cancer: a comprehensive review and a critical analysis of clinical and epidemiological evidence. *Gynecol Oncol* 2006; 101:331-41.
- Speel EJ, van de Wouw AJ, Claessen SM, et al. Molecular evidence for a clonal relationship between multiple lesions in patients with unknown primary adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2008; 123:1292-300.

- Stefansson H, Geirsson RT, Steinthorsdottir V, et al. Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis. *Hum Reprod* 2002; 17:555-9.
- Stern RC, Dash R, Bentley RC, et al. Malignancy in endometriosis: frequency and comparison of ovarian and extraovarian types. *Int J Gynecol Pathol* 2001; 20:133–9.
- Stoecklein NH, Erbersdobler A, Schmidt-Kittler O, et al. SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *Am J Pathol* 2002; 161:143-51.
- Swiersz LM. Role of endometriosis in cancer and tumor development. *Ann N Y Acad Sc* 2002; 955:281-92; discussion 293-5, 396-406.
- Szymanska J, Virolainen M, Tarkkanen M, et al. Overrepresentation of 1q21-23 and 12q13-21 in lipoma-like liposarcomas but not in benign lipomas: a comparative genomic hybridization study. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 99:14-8.
- Tai MH, Chang CC, Kiupel M, et al. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005; 26:495–502.
- Takakura S, Okamoto A, Saito M, et al. Allelic imbalance in chromosome band 18q21 and SMAD4 mutations in ovarian cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 24:264-71.
- Takei K, Kohno T, Hamada K, et al. A novel tumor suppressor locus on chromosome 18q involved in the development of human lung cancer. *Cancer Res* 1998; 58:3700-5.
- Takeuchi S, Bartram CR, Wada M, et al. Allelotype analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1995; 55:5377-82.
- Tamura M, Fukaya T, Murakami T, et al. Cytogenetic analysis of cells from endometriotic cysts of the human ovary. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 102(2):155-7.
- Tan DS, Lambros MB, Natrajan R, et al. Getting it right: designing microarray (and not 'microawry') comparative genomic hybridization studies for cancer research. *Lab Invest* 2007; 87:737-54.
- Tanaka T, Nakajima S, Umesaki N. Cellular heterogeneity in long-term surviving cells isolated from eutopic endometrial, ovarian endometrioma and adenomyosis tissues. *Oncol Rep* 2003; 10(5):1155-60.
- Tanaka T, Umesaki N. Endometriotic patient serum enhances endometrial stromal cell proliferation and viability: a preliminary study. *Int J Mol Med* 2003; 12(1):103-8.

- Tariverdian N, Theoharides TC, Siedentopf F, et al. Neuroendocrine-immune disequilibrium and endometriosis: an interdisciplinary approach. *Semin Immunopathol* 2007; 29:193-210.
- Tarkkanen M, Karhu R, Kallioniemi A, et al. Gains and losses of DNA sequences in osteosarcomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1995; 55:1334-8.
- Teague EM, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update* 2010; 16(2):142-65.
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, et al. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 1992; 13: 718-25.
- Tempfer CB, Simoni M, Destenaves B, et al. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: part II--endometriosis. *Hum Reprod Update* 2009; 15(1):97-118.
- Thomas EJ, Campbell IG. Evidence that endometriosis behaves in a malignant manner. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50(Suppl 1):2-10.
- Timpson P, Wilson AS, Lehrbach GM, et al. Aberrant expression of cortactin in head and neck squamous cell carcinoma cells is associated with enhanced cell proliferation and resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib. *Cancer Res* 2007; 67:9304-14.
- Treolar SA, Wicks J, Nyholt DR, et al. Genomewide linkage study in 1176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet* 2005; 77:365-76.
- Tu Y, Huang Y, Zhang Y, et al. A new focal adhesion protein that interacts with integrin-linked kinase and regulates cell adhesion and spreading. *J Cell Biol* 2001; 153:585-98.
- Ueda M, Yamashita Y, Takehara M, et al. Gene expression of adhesion molecules and matrix metalloproteinases in endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2002; 16:391-402.
- Umezawa M, Tanaka N, Tainaka H, et al. Microarray analysis provides insight into the early steps of pathophysiology of mouse endometriosis model induced by autotransplantation of endometrium. *Life Sci* 2009; 84(23-24):832-7.
- Uz YH, Murk W, Bozkurt I, et al. Increased c-Jun N-terminal kinase activation in human endometriotic endothelial cells. *Histochem Cell Biol* 2011; 135:83-91.
- Valle RF, Sciarra JJ. Endometriosis: treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 997:229-39.

- van der Linden J, de Goeij AF, Dunselman GA, et al. Expression of integrins and E-cadherin in cells from menstrual effluent, endometrium, peritoneal fluid, peritoneum, and endometriosis. *Fertil Steril* 1994; 61:85-90.
- van Kaam KJ, Romano A, Dunselman GA, et al. Transforming growth factor beta1 gene polymorphism 509C/T in deep infiltrating endometriosis. *Reprod Sci* 2007; 14:367-73.
- Van Patten K, Parkash V, Jain D. Cadherin expression in gastrointestinal tract endometriosis: possible role in deep tissue invasion and development of malignancy. *Mod Pathol* 2010; 23(1):38-44.
- van Rossum AG, Gibcus J, van der Wal J, et al. Cortactin overexpression results in sustained epidermal growth factor receptor signaling by preventing ligand-induced receptor degradation in human carcinoma cells. *Breast Cancer Res* 2005; 7:235-7.
- Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, Larin A, Savchenko V, et al. Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet* 2004; 41:161-70.
- Vercellini P, Crosignani PG, Somigliana E, et al. Medical treatment for rectovaginal endometriosis: what is the evidence? *Hum Reprod* 2009; 24:2504-14.
- Viganò P, D'après la communication de. Perspectives on endometriosis: new physiopathologic approaches and treatments. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2003; 32:S28-31.
- Viganò P, Somigliana E, Chiodo I, et al. Molecular mechanisms and biological plausibility underlying the malignant transformation of endometriosis: a critical analysis. *Hum Reprod Update* 2006; 12:77-89.
- Viganò P, Somigliana E, Gentilini D, et al. Back to the original question in endometriosis: Implantation or metaplasia? *J Endom* 2009; 1:1-8
- Vivacqua A, Bonofiglio D, Recchia AG, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol Endocrinol* 2006; 20:631-46.
- Von Rokitsansky C. Ueber uterusdrüsen - neubildung in uterus- und ovarial-sarcomen. *Ztsch K K Gesellsch der Aerzte zu Wien* 1860; 37:577-81.
- Wheeler JM. Epidemiology of endometriosis-associated infertility. *Reprod Med* 1989; 34(1):41-6.
- Wieser F, Schneeberger C, Tong D, et al. PROGINS receptor gene polymorphism is associated with endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77:309-12.

- Willman CL, Hromas RA. Genomic Alterations and Chromosomal Aberrations in Human Cancer Medicine 7, London: BC Decker Inc 2006; p.104-34.
- Witz CA, Montoya IA, Dey TD, et al. Characterization of lymphocyte subpopulations and T cell activation in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1994; 32(3):173-9.
- Wu RJ, Van der Hoek KH, Ryan NK, et al. Macrophage contributions to ovarian function. *Hum Reprod Update* 2004; 10:119–33.
- Wu Y, Basir Z, Kajdacsy-Balla A, et al. Resolution of clonal origins for endometriotic lesions using laser capture microdissection and the human androgen receptor (HUMARA) assay. *Fertil Steril* 2003; 1:710-7.
- Wu Y, Starzinski-Powitz A, Guo SW. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, attenuates invasiveness and reactivates E-cadherin expression in immortalized endometriotic cells. *Reprod Sci* 2007; 14(4):374-82.
- Wu Y, Strawn E, Basir Z, et al. Genomic alterations in ectopic and eutopic endometria of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2006; 62(3):148-59.
- Xie W, Bharathy S, Kim D, et al. Frequent alterations of Smad signaling in human head and neck squamous cell carcinomas: a tissue microarray analysis. *Oncol Res* 2003; 14:61-73.
- Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol* 2010; 7:164-74.
- Yamamoto S, Tsuda H, Takano M, et al. Clear-cell adenofibroma can be a clonal precursor for clear-cell adenocarcinoma of the ovary: a possible alternative ovarian clear-cell carcinogenic pathway. *J Pathol* 2008; 216:103-10.
- Yang WC, Chen HW, Au HK, et al. Serum and endometrial markers. *Best Pract Res Clin Obstet* 2004; 18:305-18.
- Yano S, Matsuyama H, Matsuda K, et al. Accuracy of an array comparative genomic hybridization (CGH) technique in detecting DNA copy number aberrations: comparison with conventional CGH and loss of heterozygosity analysis in prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 150:122-7.
- Yatsuoka T, Furukawa T, Sunamura M, et al. TU12B1-TY, a novel gene in the region at 12q22-q23.1 frequently deleted in pancreatic cancer, shows reduced expression in pancreatic cancer cells. *Oncol Rep* 2004; 12:1263-8.

- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90(12):5002-12.
- Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, et al. Possible pathophysiological roles of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52:306-11.
- Young SL. Complexity in endometrial estradiol signalling. *Reprod Sci* 2008; 14:627-8.
- Yuan J, Takahashi A, Masumori N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is frequently underexpressed in renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2006; 13:265-70.
- Zafrakas M, Tarlatzis BC, Streichert T, et al. Genome-wide microarray gene expression, array-CGH analysis, and telomerase activity in advanced ovarian endometriosis: a high degree of differentiation rather than malignant potential. *Int J Mol Med* 2008; 21(3):335-44.
- Zhai Y, Iura A, Yeasmin S, et al. MSX2 is an oncogenic downstream target of activated WNT signaling in ovarian endometrioid adenocarcinoma. *Oncogene* 2011 (*in press*).
- Zhao H, Wang Q, Bai C, et al. A cross-study gene set enrichment analysis identifies critical pathways in endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:94.
- Zhao L, Samuels T, Winckler S, et al. Cyclin G1 has growth inhibitory activity linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb tumor suppressor pathways. *Mol Cancer Res* 2003; 1:195-206.
- Zhao M, Ren C, Yang H, et al. Transcriptional profiling of human embryonic stem cells and embryoid bodies identifies HESRG, a novel stem cell gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 362(4):916-22.
- Zhao X, Li C, Paez JG, et al. An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res* 2004; 64:3060-71.
- Zhu M, Wang F, Yan F, et al. Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization. *J Biol Chem* 2008; 283:18916-25.
- Zondervan KT, Cardon LR, Kennedy SH. What makes a good case-control study? Design issues for complex traits such as endometriosis. *Hum Reprod* 2002; 17:1415-23.
- Zondervan KT, Treolar SA, Lin J, et al. Significant evidence of one or more susceptibility loci for endometriosis with near-Mendelian inheritance on chromosome 7p13-15. *Hum Rep* 2007; 33:717-28.

**Anexos**



**Anexo 1.** Caracterização das regiões mínimas alteradas por HR-CGH ( $p<0,05$ ) em cada uma das amostras de endometriose (EDT) de diferentes sítios (Grupo I).

| Caso      | Sítio da EDT | Tipo de Tecido | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Ganhos                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----------|--------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FC01-0189 | Ovário       | Epitélio       | 1p31-p36; 1q41-q44; 2p13-p14; 2p21-p25; 2q32-37; 3p14-p21; 3p21; 3p24-p25; 4p16; 4q31.1-q31.2; 4q34-q35; 5p12-p13; 5p14-p15.3; 5q23-q35; 6p21.3-p25; 7p22; 7q31-q36; 8p11.2-p22; 8q22-q24.3; 9p13-p24; 9q21-q22; 9q31-q34; 10p11.2-p13; 10q23-q26; 11q23-q25; 12q22-q24.3; 13q31-q34; 14q21-q32; 15q14-q26; 16p11.2-p13.3; 16q21-q24; 17p11.2-p13; 17q11.2-q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p12; 20q12-q13.3; 21q21-q22; 22q12-q13; Xq25 | 1p21; 1q21-q24; 1q24-q31; 1q32; 2p11.2-p12; 2q11.2-q12; 2q22-q24; 3p12-p13; 3q13.1-q21; 3q22-q25; 4p12-p13; 4p14; 4q12; 4q13-q28; 5q13-q22; 6q12-q24; 7p11.2; 7q11.2; 8q12-q21.1; 11p11.2-p13; 11q12-q13; 12q14; 12q21; 15q14-q21; Xp21-p22.1; Xq13-q24 |

Anexo 1. Continuação

| Caso      | Sítio da EDT | Tipo de Tecido | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Ganhos                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----------|--------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FC01-0189 | Sigmóide     | Epitélio       | 1q32; 1q42-q43; 2p23-p25; 2q36-q37; 3p22-p25; 3q24-q25; 3q26.3-q29; 4p15.1-p16; 4q32-q35; 5q31-q35; 6p22-p25; 6q24; 6q25-q27; 7p13-p22; 7q22-q36; 8p12-p23; 8q21.3; 8q22-q24.3; 9p21-p24; 9q22-q34; 10p12; 10p13-p14; 10q25-q26; 11p14-p15; 11q14-q22; 11q23-q25; 12p12-p13; 12q21-q24.3; 15q12-q21; 16p11.2-p13.3; 16q22; 16q24; 17p11.2-p12; 17q24-q25; 18p11.2-p11.3; 18q12-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.2-q13.4; 20p12-p13; 20q12-q13.3; Xp21-p22.3                  | 1p12-p13; 1q23-q25; 2q21; 3p12; 3p14-p21; 3q12-q13.1; 4q21-q24; 5p12-p14; 5q11.2-q13; 5q22-q23; 6q15-q16; 8q12; 9p12-p13; 10q21-q23; 11q12-q13; 14q13-q21; 14q21-q23; 15q25-q26; 17q21; 22q13; Xp11.2; Xq12-q13; Xq21                                                                              |
|           |              | Estroma        | 1p32; 1p33-p36.3; 1q32-q44; 2p21-p25; 2q35-q37; 3p21-p25; 3q25-q29; 4p15.1-p16; 4q31.3-q35; 5p14-p15.3; 5q31-q35; 6p22-p24; 6q22-q25; 7p14-p22; 7q33-q36; 8p21-p22; 8q23-q24.1; 9p21-p23; 9q31; 9q33-q34; 10p13-p15; 10q25; 12p13; 12q21-q23; 12q24.1-q24.3; 13q32; 14q23-q32; 15q23-q24; 16p12-p13.3; 16q12.2-q24; 17q21-q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q12; 18q22-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p12-p13; 20q11.2-q13.3; 22q11.2-q13; Xp21-p22.1; Xq21; Xq23-q27 | 1p13-p31; 1q21-q24; 1q25-q31; 2p11.2-p14; 2q11.2-q31; 3p12-p14; 3p21; 3q13.1-q13.3; 4q12-q31.1; 5q11.2-q22; 6p12-p21.1; 6q12-q22; 7p11.2-p13; 7q11.2-q31; 8p11.2; 8q11.2-q21.1; 8q21.3; 9p12; 10p11.2-p12; 10q11.2-q22; 11p11.2-p12; 11q12-q21; 12p11.2-p12; 12q12-q14; 13q12-q14; Xp11.2; Xq12-13 |

Anexo 1. Continuação

| Caso      | Sítio da EDT | Tipo de Tecido | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Ganhos                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------|--------------|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|           | Bexiga       | Epitélio       | 1q32-q43; 2p21-p25; 2q13-q14.1; 2q35; 4p15.1-p16; 5q34-q35(qter); 7p21; 9p21; 9q34(qter); 10q25-q26(qter); 12q23-q24.3; 13q21-q31; 16p12-p13.3; 16q22-q24; 17q22; 17q24-q25; 19q13.1-q13.3; 20q11.2-q12; 21q21-q22; Xq23-q24; Xq26-q27                                                                                                                                                                                 | 5q12-q13; 7q11.2; 7q11.2-q21; 8q13-q21.1; 10p14-p15; 11q12-q13                                                                                                                                                                                                                                                  |
| FC03-0248 | Reto         | Epitélio       | 1p13; 1p21-p22; 1p31-p32; 1q21-q31; 1q32-q42; 2p13-p15; 2p23-p24; 2q12-q21; 2q22-q24; 2q31-q32; 3p12; 3p21; 3q13.1; 3q13.3-q22; 3q24; 3q24-q25; 4p12-p14; 4q12-q21; 4q27-q28; 4q31.3-q33; 5p12-p13; 5q15-q23; 5q31-q32; 6p21.1-p21.3; 6q13-q16; 6q22; 7p12; 7p15-p21; 9p21-p22; 9q21-q22; 9q31; 10p12; 10q11.2-q21; 10q24-q26; 12p11.2; 12q13-q14; 12q15-q21; 12q21-q23; 13q13-q14; 13q14-q32; 15q21; 17q21-q22; 22q13 | 1p35-p36.1; 2q36-q37; 3q28-q29; 4p16; 6q25-q27; 8p12; 8p22-p23; 8q21.3-q23; 8q24.2-q24.3; 9p23-p24; 9q34; 10p14-p15; 11p11.2-p15; 11q12-q22; 11q23-q25; 12p13; 14q32; 15q25-q26; 16p11.2-p13.3; 16q12.1-q21; 16q23-q24; 17p11.2-p13; 18p11.2; 18q12-q21; 18q23; 19p13.4; 20p13; 21q22; Xp11.3-p11.4; Xp21-p22.3 |

Anexo 1. Continuação

| Caso      | Sítio da EDT  | Tipo de Tecido | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Ganhos                                                                                                                                                                         |
|-----------|---------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FC03-0248 | Reto-sigmóide | Epitélio       | 2p21-p24; 2q35-q36; 3p12-p14; 3p22-p26; 3q24-q25; 4q13-q21; 4q31.3-q32; 5q21; 5q31-q34; 6p12; 6p21.3-p25; 6q21-q22; 7p14-p15; 7q33-q36; 8p11.2-p12; 8q21.1-q21.3; 8q22-q24.3; 9p13-p24; 9q31-q33; 10q24-q26; 11q14-q22; 11q23-q24; 12p13; 13q21-q31; 16q21-q24; 17p12-p13; 18p11.2-p11.3; 18q22; 19p13.1; 20p11.2; 20q13.1-q13.3; Xq23-q24                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1q21-q32; 1q42; 2p11.2; 2q22-q23; 3p21; 4p14; 5p12-p13; 5q11.2; 7p11.2-p12; 7q11.2-q21; 10p11.2-p12; 10q21-q22; 11p11.2-p12; 11p14; 11q12; 12p12; 16q21; 17q22; Xp11.2; Xp11.4 |
|           |               | Estroma        | 1p13; 1p22-p36.3; 1q21-q22; 1q24-q31; 1q41; 2p11.2-p24; 2q11.2-q22; 2q24-q31; 2q36-q37; 2q37; 3p24-p26; 4p15.1-p16; 4q12-q21; 5p13-p14; 5q23; 5q31-q32; 6p11.2-p21.1; 6q12-q15; 6q21-q22; 7p12-p14; 7p14-p21; 7q11.2-q21; 8p21-p22; 8q22-q23; 8q23-q24.3; 9p12-p13; 9p21-p23; 9q21-q22; 9q22-q34; 10p12-p14; 10q11.2-q21; 10q21; 10q23-q26; 11p12-p13; 11q24-q25; 12p11.2; 12q21-q22; 13q13-q34; 14q11.2; 14q23-q24; 14q31; 15q15-q21; 16p11.2; 16p13.1-p13.2; 16q21-q24; 17p12-p13; 17q21-q25; 18q21-q22; 19p13.2-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p12; 20q11.2-q13.3; 21q21-q22; 22q11.2-q13; Xq23-q24; Xq26-q27 | 3p12-p22; 3q28-q29; 4q25-q26; 6p21.3-p22; 6p24-p25; 7q21-q22; 8p23; 9p24; 11q12-q13; 12q24.3; Xp21-p22.3                                                                       |

**Anexo 1. Continuação**

| Caso      | Sítio da EDT | Tipo de Tecido | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Ganhos                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----------|--------------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FC03-0519 | Sigmóide     | Epitélio       | 1p13; 1p31; 1q31; 1q42-q43; 2q24-q32; 3p12-p13; 3p21; 3p22-p24; 3q13.1-q22; 3q24-q26.1; 3q26.1-q26.3; 5p14-p15.1; 5q11.2-q12; 5q21-q22; 5q33-q34; 6p11.1-p21.3; 6p22; 6q12-q16; 6q21; 6q22-q27; 7p11.2-p12; 7p14-p15; 8p21; 8q23-q24.3; 9p12; 9p13-p23; 9q32-q33; 10q24; 10q25-q26; 11p15; 11q23-q24; 12q24.1-q24.2; 13q21-q31; 13q31; 14q32; 15q24-q26; 16p11.2; 18p11.2-p11.3; 18q21; 19p13.2-p13.3; 20p11.2-p12; 21q22; Xq23-q25; Xq26-q27      | 1q22-q23; 1q23-q24; 1q31-q32; 2p11.2; 2p12-p13; 2p21; 2p24-p25; 3p21; 4p12-p13; 4p14-p15.1; 4p15.3-p16; 4q22-q26; 4q34-q35; 5p13; 5p15.3; 7p21-p22; 8p23; 9q34; 10q22; 11p11.2-p12; 11q12-q13; 12p13; 12q24.3; 14q21-q22; 15q13-q14; 15q22; 17q22-q23; 17q25; 18q23; 19q13.4; 22q13; Xp22.2-p22.3 |
|           |              | Estroma        | 1p34.3-p36.3; 1q41-q43; 2p22-p23; 2p24-p25; 3q26.1-q29; 4p15.1-p16; 4q31.2-q35; 5p12-p15.3; 5q32-q35; 6q24-q27; 7p15-p22; 7q34-q36; 8q23-q24.2; 9p21-p24; 9q22; 9q34; 10q23-q26; 11p14-p15; 11p15; 11q13-q14; 11q23-q25; 12p12-p13; 12q13; 12q22-q24.3; 13q12; 13q31-q34; 14q22-q24; 14q31-q32; 15q24-q26; 16p12-p13.3; 16q21-q24; 17q21-q25; 18p11.2-p11.3; 18q22-q23; 19q13.3-q13.4; 20p11.2-p12; 20q13.1-13.2; 20q13.3; 22q13; Xp21-p22.1; Xq24 | 1p22-p31; 1q31; 2p11.2-p12; 2q22; 2q32-q33; 3p13-p14; 3q12-q13.1; 4q22-q28; 5q11.2; 5q23; 6q13-q16; 6q22-q23; 7q21; 7q22-q31; 8p11.2-p23; 9q13-q21; 10q11.2-q21; 10q22; 11p11.2; 12q15-q21; 13q14-q21; 14q24-q31; 15q14; 15q21-q22; 18q11.2-q21; 22q11.2-q12; Xp11.2-p11.4; Xq13-q23; Xq27-q28    |

**Anexo 1. Continuação**

| Caso      | Sítio da EDT | Tipo de Tecido | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Ganhos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------|--------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FC03-0519 | Ovário       | Estroma        | 1p35-p36.1; 1q42-q43; 2p12; 2p22-p23; 2q34-q37; 3p24-p25; 4p13-p16; 4q32; 4p13-p16; 4q32; 5p13-p15.3; 5q34-q35; 6p21.3-p25; 6q22-q27; 7p15-p21; 7q33-q36; 8p12-p22; 8q24.1-q24.2; 9p21-p24; 9q22-q33; 9q34; 10p13-p15; 10q24-q25; 11p14-p15; 11q23; 12p12-p13; 12q21-q24.3; 13q31-q34; 14q31-q32; 15q23-q26; 16p11.2-p13.3; 16q21-q23; 17p11.2-p13; 17q21-q22; 17q22-q23; 17q24-q25; 18p11.2-p11.3; 18q21-q23; 19p13.2-p13.3; 19q13.3; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3; 21q21-q22; 22q12-q13; Xq23; Xq25-q28 | 1p22; 1p31; 1p32-p34.3; 1q22-q24; 1q31; 2q11.2-q12; 2q21-q33; 3p13-p14; 3p21; 3q12-q13.1; 3q21; 3q26.1; 4q24-q28; 5p12-p13; 5q11.2-q23; 5q31-q32; 6p11.1-p12; 6q12-q14; 6q16-q22; 7p11.2-p12; 7p21-p22; 7q11.2-q31; 8q22; 9p12; 10p11.2; 10q11.2; 10q21; 10q22; 11p11.2; 11q12-q14; 12q12-q13; 13q12-q14; 13q14-q21; 14q21; 15q21-q22; 19q13.4; Xp11.4-p21; Xq13 |
| FC03-1965 | Sigmóide     | Estroma        | 1p32-p33; 1p34.2-p36.3; 1q32; 1q32-q44; 2p16-p21; 2p23-p24; 2q32-q37; 3p14; 3p21-p25; 3q23-q29; 4p15.1-p16; 4q31.1-q35; 5p14-p15.1; 5q32-q35; 6p23; 6q21-q27; 7p14-p22; 7q22-q36; 8p21-p23; 8q22; 8q24.1-q24.2; 9p12-p23; 9q12-q34; 10q21-q26; 11p14-p15; 11q14-q25; 12p12-p13; 12q15-q24.3; 13q12-q14; 13q21-q34; 15q12-q21; 15q22-q26; 16p12-p13.2; 16q12.1-q24; 17q21-q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.3; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3; 21q21; 21q22; 22q12-q13; 22q13      | 1p13-p31; 1q21-q23; 2p11.2-p12; 2q11.2-q24; 3p12; 3q11.2-q21; 4p12-p13; 4q12-q21; 4q24-q28; 5p12-p13; 5q11.2-q21; 5q21-q23; 6q12-q13; 8q12-q21.1; 10p11.2-p12; 10p14-p15; 14q31-q32; Xp11.4-p21; Xq12-q21                                                                                                                                                        |

Anexo 1. Continuação

| Caso      | Sítio da EDT | Tipo de Tecido | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Ganhos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------|--------------|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FC03-1965 | Sigmóide     | Epitélio       | 1p13-p22; 1q21-q31; 1q31-q32; 2p14-p23; 2q13-q14.3; 2q35-q36; 3p12-p14; 3q24-q26.1; 4q32-q33; 5p13; 5q23; 5q31-q34; 6p22; 6q14-q15; 6q21; 6q23-q24; 7q21-q22; 7q31; 8p12-p22; 8q23; 9p21; 10p12; 10q21-q22; 10q22-q25; 11q14-q23; 11q23-q24; 12q13; 12q14-q15; 12q21; 12q23-q24.1; 13q12-q21; 13q31-q32; 14q12-q13; 14q24; 15q14-q15; 15q21-q22; 15q24-q25; 17p11.2; 17q21-q22; 18p11.2; 18q12-q22; 20q11.2-q12; 21q21; 22q12-q13; Xp11.2-p21; Xq21; Xq22-q25; Xq25-q27                                          | 1q43-q44; 2p25; 2q23; 3p25-p26; 4p14; 4p15.3-p16; 4q21; 4q24-q26; 4q35; 5p15.2-p15.3; 5q11.2-q12; 5q15-q21; 6p23-p25; 7p21-p22; 9p23-p24; 9q22; 9q31-q32; 9q34; 11q12-q13; 14q11.2-q12; 16p13.3; 19q13.3; 20p13; 20q13.3; 21q22; 22q13                                                                                                                                                                      |
|           | Vesical      | Estroma        | 1p34.2-p36.3; 1q41; 1q42-q44; 2p24-p25; 2q37; 3p24-p25; 3q26.2-q26.3; 4q34-q35; 5p14-p15.3; 5q14; 5q15-q21; 5q31-q35; 6p23-p24; 6q24-q27; 7p15-p21; 7p21-p22; 7q31-q33; 7q35-q36; 8p12-p22; 8p23; 8q23-q24.2; 9p13-p21; 9p23; 9q34; 10p12-p14; 10q22-q26; 11p15; 11q13-q15; 12p12-p13; 12q21-q24.3; 13q31; 14q24-q32; 15q24-q25; 16p11.2-p13.3; 16q12.2-q24; 17p11.2-p13; 17q12-q21; 17q22; 17q24-q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q23; 19q13.1-q13.3; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.3; 21q21-q22; 22q11.2-q13; Xp21-p22.3 | 1p12-p31; 1q21-q32; 2p11.2-p21; 2q11.2-q12; 2q21-q24; 2q31-q34; 3p12-p21; 3q12-q23; 3q29; 4p15.3; 4q12-q13; 4q22-q31.3; 5q11.2-q13; 5q23; 6p11.2-p21.1; 6p21.3-p22; 6q12-q22; 6q22; 7p12-p13; 7q11.2-q21; 7q21-q22; 7q31; 8p11.2-p12; 8q11.2-q22; 9p12-p13; 9q21-q22; 10q11.2; 11p11.2; 11q12-q13; 11q14; 12q12-q21; 13q13-q14; 13q21-q22; 14q11.2-q22; 15q15-q22; 19p13.2-p13.3; 19q13.4; Xp11.2; Xq12-q23 |

**Anexo 1. Continuação**

| Caso      | Sítio da EDT | Tipo de Tecido | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Ganhos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------|--------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FC03-1465 | Peritônio    | Epitélio       | 2q31-q32; 2q33-q36; 3q25-q26.1; 4q31.1; 4q31.3-q34; 5p14-p15.1; 5q14; 5q34; 6p12; 7p14-p21; 7q33-q36; 8p11.2-p22; 8q22-q24.3(qter); 9p21; 10q25-q26; 11q22-q23; 12p12-p13; 12q23-q24.3; 13q12-q13; 13q21-q22; 13q31-q33; 13q34(qter); 14q22-q23; 14q24-q32(qter); 16p12-p13.1; 16p13.1-p13.2; 16q21-q24(qter); 18p11.2-p11.3; 18q22; 19q13.1-q13.4(qter); 20p11.2-p12; 20q13.2-q13.3; 21q21-q22 | 6p25; 7q21; 10p11.2; 10p15; 10q11.2-q21; 11p11.2; 11q12-q13; 11q25(qter); 12q13-q14; 17p11.2; 17p12-p13                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| FC04-1080 | Ovário       | Epitélio       | 2q14.2-q22; 2q32; 3q13.3; 3q21-q24; 4p16; 4q12-q13; 5q13-q31; 5q34-q35; 6p12-p21.3; 7p12; 9q22; 9q31-q32; 9q34; 12q21-q24.3; 13q13; 13q34; 14q22-q24; 14q24-q32; 15q22-q25; 15q25-q26; 16q21-q24; 17p11.2-p12; 18q22; 19q13.1-q13.3; 20q13.3; 21q22; Xq24-q25; Xq28                                                                                                                             | 1p22-p31; 1p34.2-p36.1; 1q21-q24; 1q25-q44; 2p11.2-p15; 2p22-p24; 2q11.2-q12; 2q22-q23; 2q24; 2q32-q34; 2q35-q37; 3p14-p26; 3q26.3-q27; 4p14-p15.1; 4q21-q26; 4q27-q28; 4q32-q33; 5p12-p15.3; 5q12-q13; 5q14; 6p24-p25; 6q12; 6q26-q27; 7p21; 8p11.2-p22; 8q11.2-q24.1; 9p12; 9p23-p24; 10p11.2-p15; 10q11.2-q21; 11p11.2-p14; 11p14-p15; 11q12-q13; 11q14-q23; 13q21; 13q31; 13q32; 14q11.2-q13; 16p13.1-p13.3; 17q23-q24; 18p11.3; 21q11.2-q21; 22q11.2-q13; Xq21; Xq26-q27 |

Anexo 1. Continuação

| Caso      | Sítio da EDT | Tipo de Tecido | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Ganhos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------|--------------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FC04-1080 | Ovário       | Estroma        | 1p13-p21; 1p22-p31; 1p31-p36.1; 1p36.3; 1q21-q24; 1q31-q32; 1q31-q32; 1q32-q41; 2p11.2-p14; 2p16-p21; 2p22-p23; 2q11.2-q22; 2q32; 3p12-p22; 3q13.3-q24; 4q13-q26; 4q28; 5q14; 5q23-q31; 6p12-p21.3; 7p12; 7p14-p15; 7q22-q31; 7q31; 8p11.2-p21; 9q22-q32; 10p11.2; 10q11.2; 10q21-q26; 11q13-q14; 12q13-q15; 12q22-q24.2; 13q14; 13q14-q21; 14q11.2-q13; 14q21; 14q12-q32; 15q21-q22; 15q23-q24; 16p11.2-p13.2; 17q11.2-q22; 18q21; 18q22-q23; 19q13.2; 19q13.3-q13.4; 21q22; 22q12-q13; 22q13; Xq22-q26 | 1q42-q44; 2q36-q37; 3p24-p25; 3q13.1; 3q27-q28; 4q31.3-q34; 5p12-p15.3; 6p22-p25; 6q16-q22; 7p21-p22; 8q24.2-q24.3; 9p21-p24; 10p12-p15; 12q21; 13q31-q34; 15q26; 16q12.1-q22; 16q24; 18p11.2-p11.3; 18q11.2; 20p11.2-p13; Xp21-p22.1; Xq21                                                                                                                                                                                                 |
|           | Inter-sacro  | Epitélio       | 1p31; 1p35-p36.1; 1q32-q44; 2q37; 3p24-p26; 5p14-p15.3; 5q34; 6q23-q25; 7p22; 8q24.1-q24.3; 9q34; 10q25-q26; 12p12-p13; 14q23-q332; 15q26; 16p13.2-p13.3; 16q12.1-q13; 16q22-q24; 17p11.2; 17q21-q25; 18q11.2-q12; 18q21-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p12; 20q11.2-q13.3; Xq23-q28                                                                                                                                                                                                         | 1p13-p31; 1q21-q31; 2p11.2-p25; 2q12-q24; 3p12-p21; 3q13.1-q21; 3q22-q24; 3q29; 4p12-p13; 4p14; 4q12-q13; 4q21-q32; 4q34-q35; 5p13; 5q11.2; 5q12-q15; 5q21-q23; 5q31; 6p12-p21.3; 6q12-q22; 7p11.2-p12; 7p13-p14; 7q11.2-q31; 7q32-q33; 8p11.2-p23; 8q12; 9p12-p13; 9p21-p22; 9q21-q33; 10p11.2-p12; 10p14-p15; 10q11.2-q22; 10q23-q24; 11p11.2-p14; 11p15; 11q12-q25; 12p11.2; 13q13-q21; 17p12-p13; 18p11;3; Xp11.2; Xp21-p22.1; Xq12-q21 |

Anexo 1. Continuação

| Caso      | Sítio da EDT | Tipo de Tecido | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Ganhos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----------|--------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FC04-1080 | Inter-sacro  | Estroma        | 1p32; 1p35-p36.3; 2p21-p35; 2q36-q37; 3p23-p25; 3q27-q28; 4p15.1-p16; 4q31.2-q35; 5q31-q33; 5q34-q35; 6q24-q25; 6q26; 7p15-p22; 7q33-q36; 8q24.1-q24.3; 9p21; 9p23-p24; 9q33-q34; 10q25-q26; 11q22-q25; 12p13; 12q22-q24.3; 14q11.2-q12; 14q23-q24; 14q32; 15q23-q26; 16p13.1-p13.3; 17q22-q25; 18p11.2-p11.3; 18q22-q23; 19p13.2-p13.3; 20p12-p13; 22q12-q13; Xq27-q28 | 1p12-p21; 1p22-p31; 1q21-q24; 2p11.2-p13; 2q11.2-q13; 2q22-q32; 3p12-p14; 3q13.1-q13.3; 4p12-p14; 4q13-q24; 5p12-p14; 5q11.2-q22; 6p11.2-p22; 6q12-q16; 7p11.2-p13; 7q11.2-q22; 8p11.2-p12; 8q11.2-q21.1; 8q21.3-23; 9p12-p13; 10p11.2; 10q11.2-q21; 11p11.2-p14; 11q12-q13; 12p11.2; 12q12-q13; 13q12-q13; 15q11.2-q15; 15q21; 16q12.1-q13; 16q24; 19q13.1-q13.3; 19q13.4; 21q11.2-q22; 21q22; Xp11.2; Xq12-q21; Xq21-q24                        |
|           | Para-tubárea | Epitélio       | 1p32-p35; 1q44; 2p23-p24; 9p21-p22; 9q21-q31; 10q25-q26; 11q22-q23; 13q14-q33; 18q11.2-q12; 18q23; 20p12; Xq25-q26                                                                                                                                                                                                                                                      | 1p12-p21; 1q22-q24; 2p11.2-p12; 2p16; 2q11.2-q21; 2q22-q23; 3p12-p14; 3p21-p23; 3q26.1; 3q27-q28; 4p13; 4p15.1-p16; 4q25-q26; 5p12-p13; 5q11.2-q13; 5q23-q31; 6p23-p25; 6q12-q16; 7p11.2-p14; 7p21-p22; 7q11.2-q22; 8p22; 8p23; 10q23; 11q12-q13; 12p12-p13; 12q23-q24.1; 14q32; 16p11.2; 16p13.3; 16q23-q24; 17p11.2-p13; 19p13.1-p13.3; 19q13.3-q13.4; 20q13.2-q13.3; 21q21; 21q22; 22q11.2-q13; Xp11.2; Xp22.1-p22.3; Xq13; Xq22-q23; Xq27-q28 |

Anexo 1. Continuação

| Caso      | Sítio da EDT    | Tipo de Tecido | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Ganhos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------|-----------------|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FC04-1080 | Para-tubárea    | Estroma        | 1p31-p33; 1p36.1-p36.2; 1q31; 1q32-q41; 2p16-p22; 2p22-p23; 3p14-p21; 3p21-p24; 3q24-q26.1; 4q31.1-q34; 9p13-p21; 10p12; 10p13-p14; 13q22-q31; 16p12-p13.3; 18q22-q23; 19p13.2-p13.3; 19q13.1; 20p11.2-p12; 20q11.2-q12; 22q11.2-q13; Xp21; Xq21-q22                                                                                                                                                       | 1p11-p21; 1q23; 2p11.2-p12; 2q11.2-q13; 2q14.3-q21; 2q22-q24; 2q37; 3q13.1-q13.3; 3q29; 4p12; 5p14; 6p12-p21.3; 6q12-q13; 6q25-q27; 7p11.2-p13; 8p22-p23; 9q13-q22; 9q32-q33; 9q34; 11p11.2-p13; 11q12; 11q23-q24; 11q25; 12p11.2-p13; 12q12-q21; 14q11.2-q13; 14q21-q22; 14q32; 15q22-q24; 15q26; 16q21-q24; 17p12; 17p13; 17q11.2-q12; 17q22-q25; 19q13.4; 20q13.3; 21q22; Xq27-q28 |
|           | Reto-sigmóide-I | Epitélio       | 2p12-p13; 2p14-p16; 2p16-p21; 2p22-p25; 2q13-q22; 2q34-q37; 3p24; 4p15.1-p16; 4q34; 5p14-p15.1; 5q32-q35; 6q24-q25; 8p21-p23; 8q23-q24.3; 9p13-p24; 10p14-p15; 10q24-q26; 11p14-p15; 11q23; 11q23-q24; 12p12-p13; 12q14-q21; 12q22-q24.3; 13q22-q33; 14q24-q32; 15q22-q23; 15q25-q26; 16p12; 16q21-q22; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q12; 18q21-q23; 19q13.1-q13.2; 20q12-q13.3; 22q12-q13; Xp22-p22.1; Xq26-q28 | 1p22-p31; 1q21-q24; 1q32; 3p12; 3q13.3-q21; 3q29; 4q12-q13; 4q27-q28; 5q11.2-q13; 6p12; 6p21.3; 7p12-p21; 7q11.2-q31; 8q11.2-q21.3; 9q34; 10q11.2-q21; 11p11.2-p12; 11q12-q13; 11q25; 13q12-q13; 14q11.2-q12; 15q21; 17q21; 22q13; Xq12-q13                                                                                                                                           |

Anexo 1. Continuação

| Caso      | Sítio da EDT     | Tipo de Tecido | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Ganhos                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------|------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FC04-1080 | Reto-sigmóide-I  | Estroma        | 1p32-p34.2; 1p36.1-p36.3; 1q24-q25; 1q43-q44; 2p13; 2p16-p25; 2q35-q37; 3p21-p25; 3q22-q29; 4p14-p16; 4q21; 4q22-q28; 4q28-q34; 5p12-p15.3; 5q12-q13; 5q31; 5q32-q35; 6p23-p25; 6q24-q26; 7p15-p21; 7q31-q36; 8p12-p23; 8q22-q24.3; 9p12-p24; 9q32-q34; 11p12-p15; 11q23-q25; 12p12-p13; 12q21-q24.3; 13q14; 13q21-q22; 13q22-q34; 14q31-q32; 15q25-q26; 16q13-q21; 16q23-q24; 17p12-p13; 17q24-q25; 18p11.2-p11.3; 18q21-q22; 19p13.1-p13.3; 19q13.1; 19q13.2-q13.4; 20p11.2-p12; 20q11.2; 20q13.2-q13.3; 21q21-q22; 22q12-q13; Xp21; Xq26-q28                    | 1p21-p31; 1q22-q23; 2p11.2-p12; 2q11.2-q12; 2q21-q24; 4q12-q13; 4q35; 5q15-q21; 6p11.2-p12; 6p21.3; 6q12-q14; 6q22; 7p11.2-p12; 7q11.2-q12; 10p14-p15; 10q11.2-q24; 11q12-q13; 11q13; 12q12-q15; 15q11.2; 15q21-q22; 17q11.2-q21; Xp11.2; Xq12-q21; Xq22-q23 |
|           | Reto-sigmóide-II | Epitélio       | 1p31; 1p32-p36.1; 1p36.2-p36.3; 1q41-q44; 2p22-p25; 2q34-q37; 3p22-p25; 3q26.1-q26.3; 4p15.1-p16; 4q31.3-q35; 5p13-p15.3; 5q32-q35; 6p12-p21.2; 6p22-p25; 6q22-q27; 7p12; 7p14-p15; 7p21; 7q31-q36; 8p12-p22; 8q22-q24.3; 9p12-p24; 9q21-q34; 10p12-p14; 10q23-q26; 11p13-p15; 11q14-q25; 12p11.2-p13; 12q15-q24.3; 13q21-q31; 14q11.2-q12; 14q23-q24; 14q31; 15q12-q15; 15q22-q26; 16p12-p13.3; 16q22-q24; 17q22-q25; 18p11.2-p11.3; 18q12; 18q21-q23; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q12; 21q11.2-q22; 22q12-q13; Xp21-p22.2; Xq21; Xq23-q27 | 1p12-p13; 1q22; 2q22; 3q13.3; 5q11.2-q12; 11q12-q13                                                                                                                                                                                                          |

Anexo 1. Continuação

| Caso      | Sítio da EDT      | Tipo de Tecido     | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Ganhos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------|-------------------|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FC04-1080 | Reto-sigmóide-II  | Estroma            | 1p31-p36.3; 1q25-q44; 2p13-p16; 2p21-p25; 2q33-q37; 3p12-p26; 3q21-q29; 4p14-p16; 4q31.3-q35; 5p14-p15.3; 5q31-q35; 6p21.3-p25; 6q22-q27; 7p13-p22; 7q31-q36; 8p12-p23; 8q23-q24.3; 9p13-p24; 9q22-q34; 10p11.2-p15; 10q23-q26; 11p14-p15; 12q21-q24.3; 13q14; 13q22; 14q11.2; 14q21-q32; 15q11.2-q26; 16p12-p13.3; 16q12.1-q24; 17p11.2-p13; 17q24-q25; 18q12-q23; 19p13.1-p13.3; 21q11.2-q22; 22q13; Xp21-p22.3; Xq27-q28 | 1p13; 1p21-p22; 2p11.2-p12; 2q11.2-q23; 3q13.1-q13.2; 4q13-q25; 5p12-p14; 5q11.2-q23; 6p12; 6q12-q21; 7q11.2-q22; 9p12; 10q11.2-q21; 11p11.2-p12; 11q12-q13; 12p11.2-p12; 12q12-q14; 13q31-q34; Xq12-q22                                                                                                               |
|           | Reto-sigmóide-III | Epitélio + Estroma | 1p31; 1p34.3-p35; 1p36.1-p36.3; 1q32; 2p13-p16; 2p21-p24; 2q34-q36; 3p14-p21; 3p22-p23; 3q23-q24; 4p14-p15.3; 4q28-q31.2; 5p15.3; 5q31-q33; 7q31-q36; 8p12; 8q24.1-q24.2; 9q22-q33; 10q21-q22; 11p13-p14; 11q14-q23; 11q23-q24; 12q13; 12q21-q24.2; 13q12-q13; 13q14-q22; 14q11.2-q24; 15q13-q26; 16p12-p13.3; 16q12.2-21; 20p12-p13; 20q11.2-q12; 20q13.1-q13.2; Xq21-q22; Xq25-q26                                        | 1p13; 1q22-q24; 2p11.2-p12; 2q12; 2q31-q33; 3p12; 3p25-p26; 4q27-q28; 4q34-q35; 5q11.2-q12; 5q14; 5q35; 6p12-p25; 6q12-q13; 6q16-q22; 6q23-q24; 7p21; 7q11.2; 7q21-q22; 8p22-p23; 8q21.3-q22; 9p12-p13; 9q34; 10p12-p13; 16q24; 17q11.2-q12; 18p11.2-p11.3; 18q11.2; 19q13.1-q13.2; 19q13.4; 21q22; 22q11.2-q12; 22q13 |

**Anexo 1. Continuação**

| Caso      | Sítio da EDT   | Tipo de Tecido | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Ganhos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----------|----------------|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FC04-1132 | Retro-cervical | Epitélio       | 1p32-p36.3; 1q41-q44; 2p16-p25; 2q32-q37; 3p22-p25; 3q26.2-q29; 4p16; 4q33-q35; 5p14-p15.2; 5q32-q35; 6p24-p25; 6q23-q27; 7q31-q36; 8p22-p23; 8q23-q24.3; 9q31-q34; 10p13; 10q24-q26; 11p14-p15; 11p15; 11q13; 11q21-q25; 12p12-p13; 12q21-q24.3; 13q32-q33; 14q31-q32; 15q24-q25; 16p13.2-p13.3; 16q13-q24; 17q12-q21; 17q24; 18q12-q22; 19q13.1-q13.2; 20q11.2-q13.2; 21q22; 22q13; Xp22.2; Xq21-q28                                                           | 1p13; 1p21-p22; 1p31; 1q21-q32; 2p11.2-p14; 2q11.2-q14.1; 2q22-q31; 3p12-p13; 3p21; 3q13.1-q21; 3q22-q24; 4p12-p15.3; 4q12-q31.3; 5p12-p13; 5q11.2-q23; 6p11.2-p21.3; 6p22; 6q12-q22; 7p11.2-p13; 7q11.2-q22; 8p11.2-p12; 8q12; 8q13-q21.1; 8q21.3-q22; 9q21; 10p11.2-p12; 10q11.2-q21; 10q23; 11p11.2-p12; 12p11.2; 12q12-q21; 13q14-q22; 13q33-q34; 14q12-q13; 14q22-q24; 15q15-q21; 15q21-q22; 15q26; 16p11.2-p12; 17p11.2-p12; 17p13; 21q11.2-q21; 21q22; Xp11.4-p21; Xq12-q13 |
|           |                | Estroma        | 1p32-p36.3; 1q31; 1q32-q43; 2p23-p24; 2q35-q37; 3p24-p25; 4p15.2-p16; 4q32-q35; 5p15.2-p15.3; 6p21.3-p25; 6q24-q27; 7p13-p15; 7p15-p22; 7q32-q36; 8p12-p21; 8p22-p23; 8q24.2-q24.2; 9p21-p23; 9q21-q22; 9q31-q34; 10p14-p15; 10q23-q26; 11p14-p15; 11q23-q24; 12q22-q24.3; 13q31-q32; 13q33-q34; 15q13-q26; 16p11.2-p13.3; 16q12.2-q24; 17p11.2-p13; 17q21-q22; 17q24-q25; 18p11.2-p11.3; 18q12-q22; 19q13.1-q13.4; 21q21-q22; 22q12-q13; Xp22.1-p22.3; Xq26-q27 | 1p12-p31; 1q21-q24; 2p11.2-p12; 2p13-p21; 2q11.2-q12; 2q14.1-q34; 3p12; 3p13-p14; 3p21; 3q13.1-q21; 3q22-q24; 4p13; 4q12-q31.3; 5p12-p14; 5q11.2-q33; 6p12; 6q21-q22; 7q11.2-q22; 8q12-q23; 8q24.3; 9p12; 10p11.2; 10q11.2-q22; 11p11.2-p14; 11q12-q13; 12p11.2-p12; 12q12-q21; 13q21; 14q13-q24; 17q22-q23; 18q23; 20p12-p13; 22q11.2; Xp11.4-p21; Xq12-q21; Xq21                                                                                                                 |

**Anexo 1. Continuação**

| Caso      | Sítio da EDT      | Tipo de Tecido | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Ganhos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------|-------------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FC04-1132 | Ligamento Redondo | Estroma        | 1p31-p36.3; 1q41-q44; 2p22-p24; 2q35-q36; 2q37; 3p22-p26; 3q26.3-q29; 4p15.2-p16; 4q32-q35; 5p14-p15.3; 6p21.3-p25; 6q24-q27; 7p13-p22; 7q31-q32; 7q33-q36; 8p22-p23; 8q24.1-q24.3; 9p23; 9q31-q34; 10q23-q25; 10q25-q26; 11p13-p14; 11p14-p15; 11q22-q23; 11q23-q25; 12p12-p13; 12q22-q24.3; 13q31-q34; 14q24-q32; 15q24-q26; 16p12-p13.3; 16q22-q24; 17p11.2; 17p12-p13; 17q12-q22; 17q24-q25; 18p11.2-p11.3; 18q11.2-q12; 18q21; 18q22-q23; 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p12; 21q22; 22q11.2-q13; Xq24-q25 | 1p12-p22; 1p22-p31; 1q21-q24; 1q31; 1q32; 2p11.2-p21; 2q11.3-q33; 3p12; 3p13-p14; 3p21; 3q12-q21; 3q23-q25; 4p12-p13; 4q12-q31.1; 4q31.3; 5p12; 5q11.2-q32; 6p12-p21.1; 6q12-q23; 7p11.2-p12; 7q11.2-q21; 8p11.2-p12; 8q11.2-q21.3; 8q22-q23; 9p12-p13; 9q13-q22; 10p11.2; 10q11.2-q22; 11p11.2; 11q12-q13; 12p11.2; 12q12; 12q21; 13q11-q14; 13q14-q21; 14q11.2-q23; 16q12.2-q21; 19p13.1; 20q11.2; Xp11.2-p21; Xq12-q23; Xq26-q27 |
|           | Reto-sigmóide     | Epitélio       | 1p31; 1q32-q41; 2q37; 3q29; 4p15.1-p15.3; 4q21; 4q24-q25; 4q26-q28; 4q31.1-q31.3; 4q33-q35; 6p12; 8p21-p22; 8q22-q24.3; 9p21; 9q31; q34; 10p12; 10p13-p14; 10q11.2-q21; 10q26; 11p11.2; 11p12-p15; 11q23-q25; 12p12; 12q23-q24.3; 15q23-q24; 15q25-q26; 15q26; 16p11.2; 16p12-p13.3; 16q21-q24; 17q24-q25; 18p11.3; 18q22-q23; 21q21; 21q22; 22q13                                                                                                                                                      | 1p21-p22; 1p34.1-p34.3; 1q21-q23; 2p21-p22; 2p24-p25; 2q11.2; 2q22-q24; 3p14-p21; 3q25-q26.1; 3q26.1-q26.3; 5p12-p13; 6q21-q22; 10q23; 10q25                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

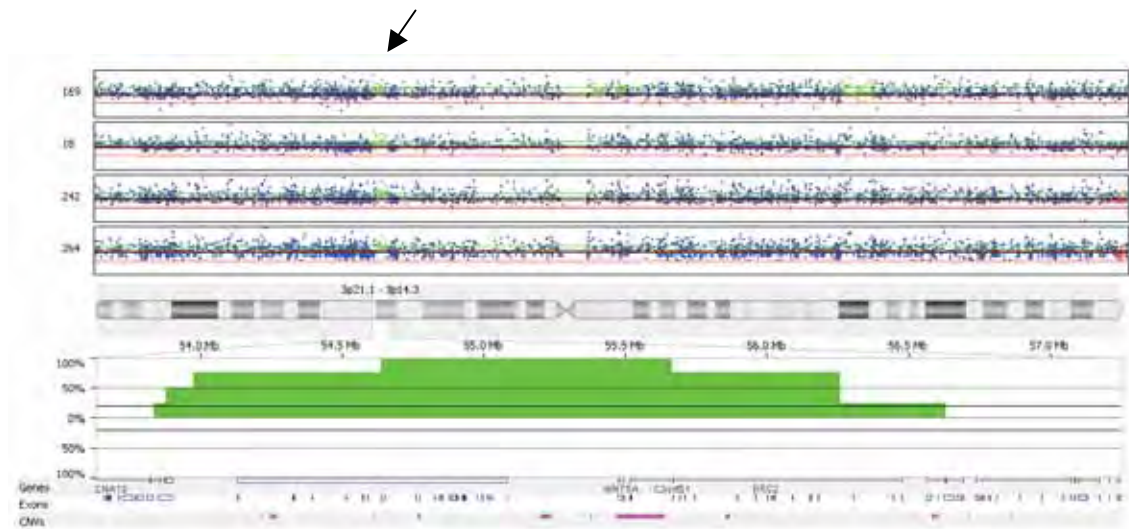
Anexo 1. Continuação

| Caso      | Sítio da EDT  | Tipo de Tecido | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Ganhos                                                                                                               |
|-----------|---------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FC04-1132 | Reto-sigmóide | Estroma        | 1p31; 1p31-p32; 1p36.1-p36.2; 1q32-q44; 2p13-p14; 2p16-p21; 2p22-p24; 2q36; 3q24; 3q27-q29; 7p14; 7q31; 7q33-q34; 8p21-p22; 8q21.3-q22; 8q23-q24.1; 9q22-q31; 9q34; 10q24-q25; 11p14-p15; 11q23-q24; 12q23-q24.2; 15q22-q23; 16p12-p13.3; 16q21-q23; 17q24-q25; 18p11.2-p11.3; 19p13.1-p13.3; 19q13.1-q13.3; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.1; 21q21-q22                                                                                                                                                                                                                                                | 1q22-q23; 4q12-q21; 4q22-q31.3; 4q32-q34; 4q35; 6q27; 7q21; 9p24; 11q12-q13; 12p11.2-p12; 12p13; 15q26; Xp11.3-p11.4 |
| FC04-1181 | Sigmóide      | Epitélio       | 1p31-p36.2; 1q31; 1q41-q43; 2p14-p15; 2p21-p24; 2q13-q14.1; 2q31-q32; 2q33-q36; 3p24-p25; 3q22; 3q24-q28; 4p13-p15.3; 4q22; 4q24-q32; 5p15.3; 5q13-q14; 5q15-q21; 5q33-q34; 6p11.2-p12; 6p12-p23; 6q22-q24; 7p14-p21; 7p21-p22; 7q22-q33; 7q36; 8p12; 8p21; 8q11.2-q12; 8q21.1-q24.1; 9p21-p23; 10q22-q26; 11p11.2; 11p14; 11q13-q14; 11q22-q23; 11q24; 12q14-q21; 12q21-q24.3; 14q21; 14q23-q24; 15q14-q21; 15q22-q25; 16p11.2-p12; 17p11.2-p12; 17p13; 17q21; 17q22-q23; 18p11.2; 18q11.2; 18q21-q22; 18q22-q23; 19p13.1-p13.2; 19q13.1-q13.2; 20p11.2-p13; 21q21-q22; 22q11.2; 22q13; Xq23-q27 | 1q21-q24; 8p23; 14q32; Xp11.4-p21; Xp22.1-p22.3                                                                      |

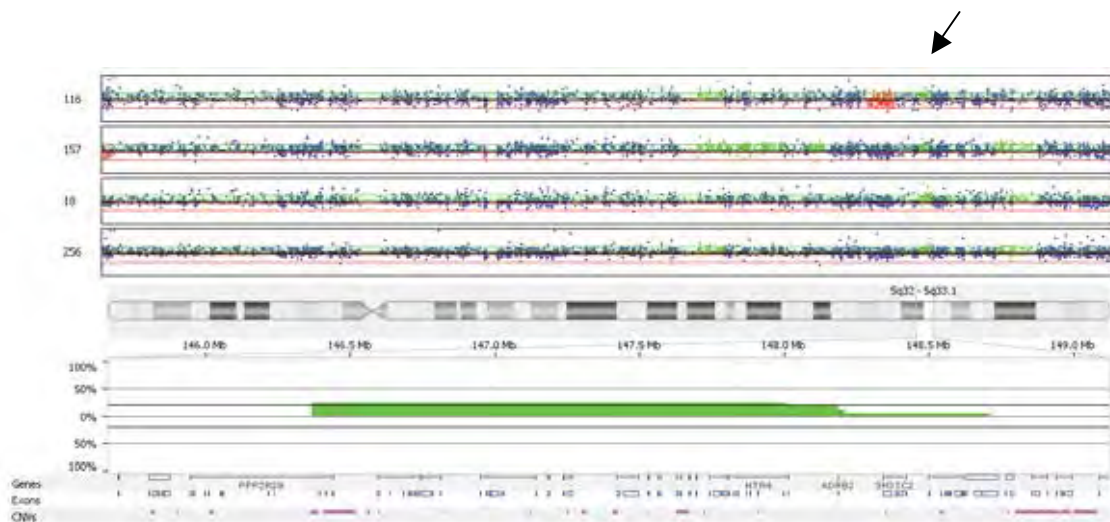
Anexo 1. Continuação

| Caso      | Sítio da EDT | Tipo de Tecido | Perdas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Ganhos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------|--------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FC04-1181 | Sigmóide     | Estroma        | 1p12-p22; 1p35-p36.3; 1q31-q32; 1q41-q42;<br>2p13; 2p16-p21; 2q14.1-q21; 2q24-q31; 2q37;<br>3p25-p26; 3q28-q29; 5q11.2-q13; 5q21; 5q31-<br>q25; 6p11.1-p12; 6q23-q24; 6q27; 7p12-p13;<br>8p12; 8q24.3; 9p21; 9q21-q22; 10q11.2-q21;<br>11q22-q23; 11q25; 12q13-q14; 12q22-q23;<br>14q12-q32; 15q15-q21; 15q24-q25; 16q24;<br>17q11.2-q12; 18p11.2-p11.3; 18q22-q23;<br>19q13.1; 20p11.2-p13; 20q11.2-q12; Xq23-q24 | 1q21-q23; 2q32; 2q34-q35; 3p12; 3p13-p14;<br>3p21-p22; 3q13.1-q21; 3q23-q24; 3q25-q26.3;<br>4p14-p15.1; 4q12-q13; 4q21-q25; 4q27-q32;<br>5p12-p14; 5p14-p15.3; 6p21.1-p22; 6p21-p24;<br>6q15-q16; 7p21; 7q21-q22; 7q33-q36; 8p21;<br>10p12-p13; 10q21; 10q23; 11p13-p14;<br>12p11.2; 12p13; 16p12-p13.1; 16p13.1-p13.3;<br>18q21; Xp22.1-p22.3; Xq21-q22 |

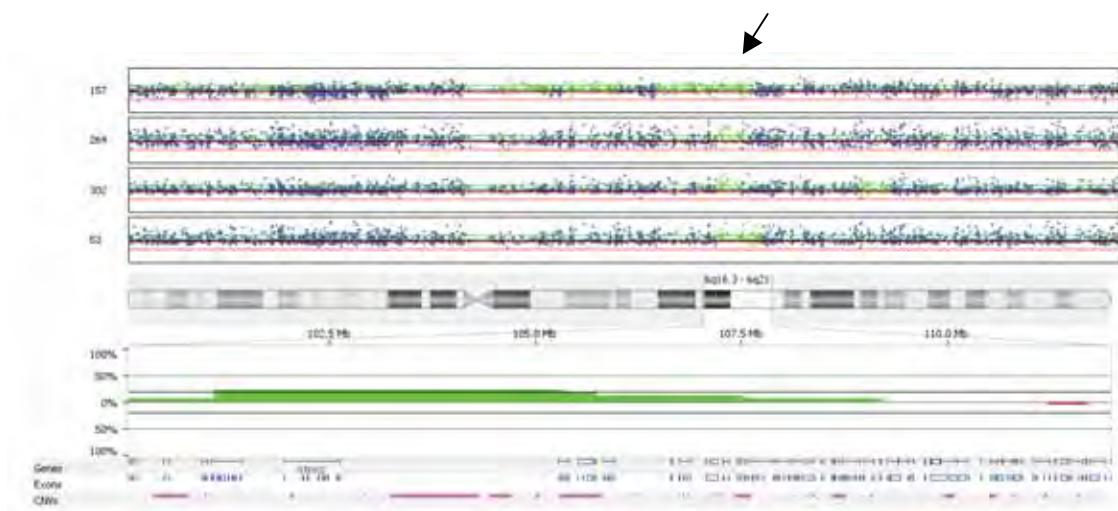
**Anexo 2.** Representação gráfica das alterações detectadas em mais de 20% dos casos de EDT intestinal avaliados neste estudo. Os esquemas mostram o padrão de marcação de cada uma das sondas ao longo de cada cromossomo envolvido em alteração nos casos que mostraram ganhos (destacados em verde) e/ou perdas (em vermelho). A seta indica a alteração significativa presente em cada cromossomo. Adaptação de imagens obtidas no *software Nexus version 5.0*.



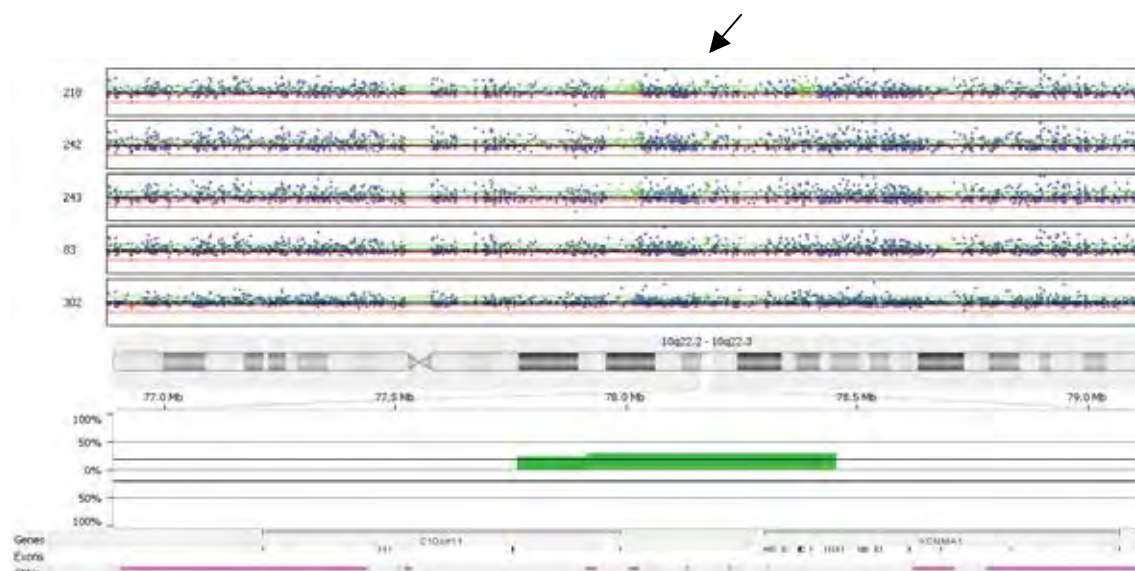
**Anexo 2A.** Ganho em 3p.14.



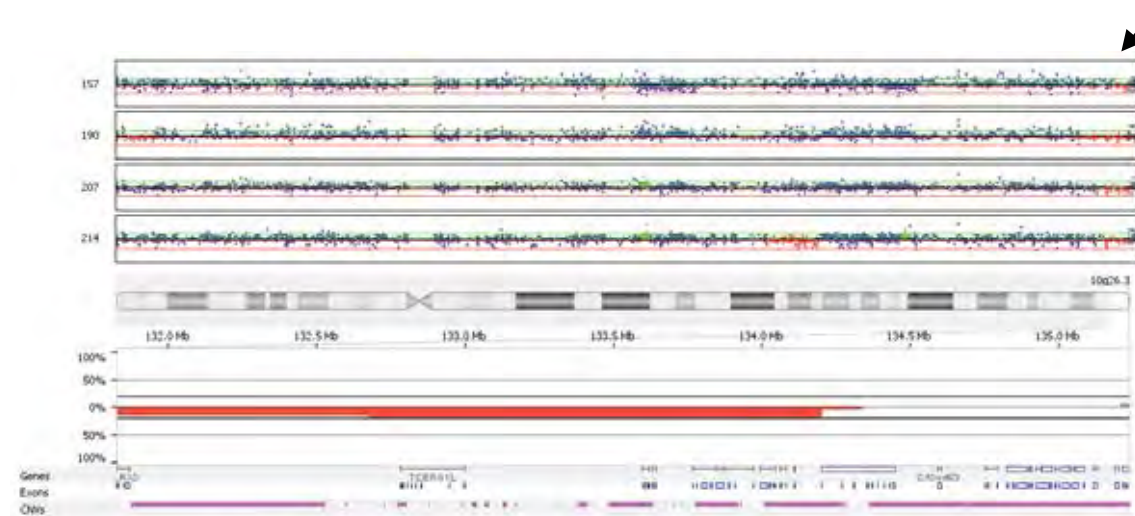
**Anexo 2B.** Ganho em 5q32-q33.1.



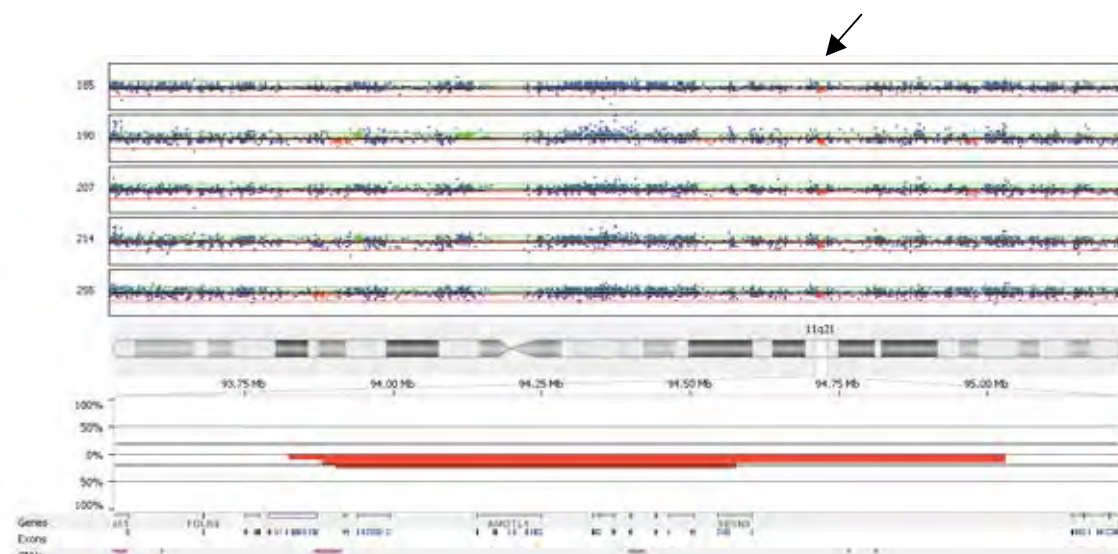
Anexo 2C. Ganho em 6q16.3-q21.



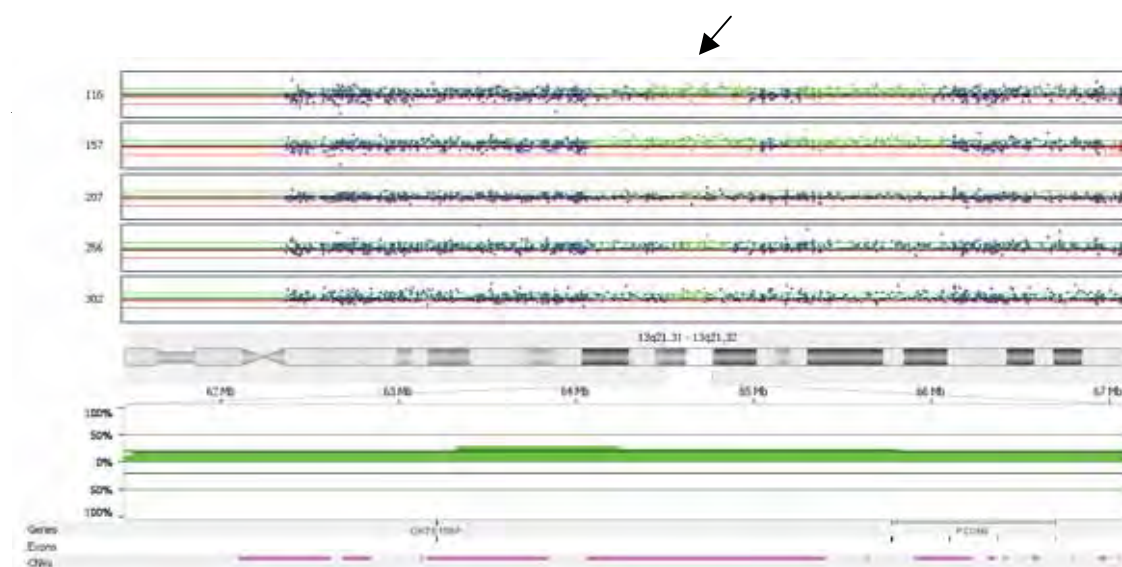
Anexo 2D. Ganho em 10q22.3.



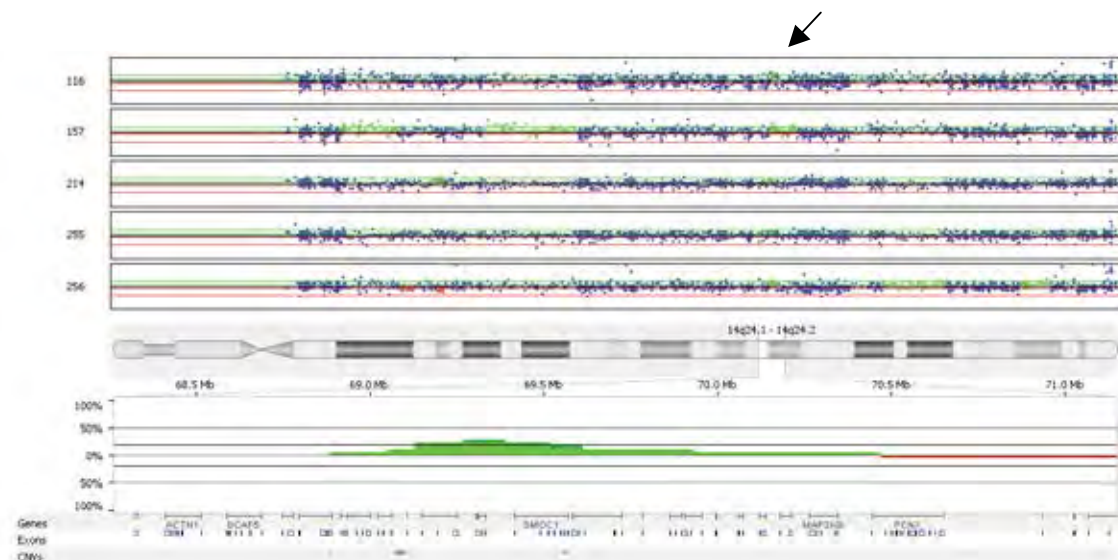
Anexo 2E. Perda em 10q26.3.



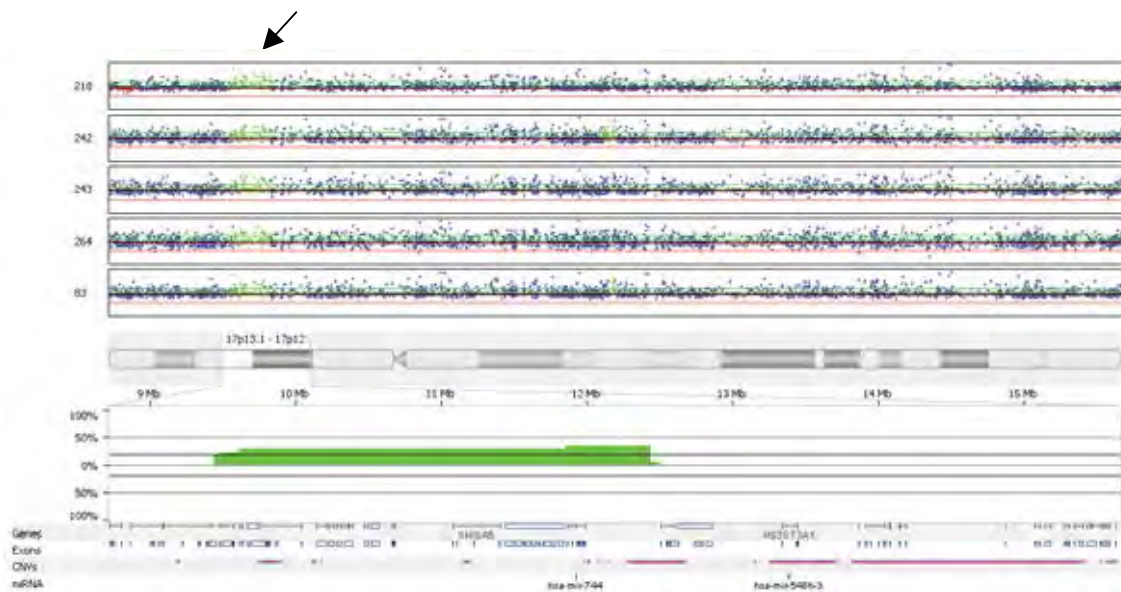
**Anexo 2F.** Perda em 11q21.



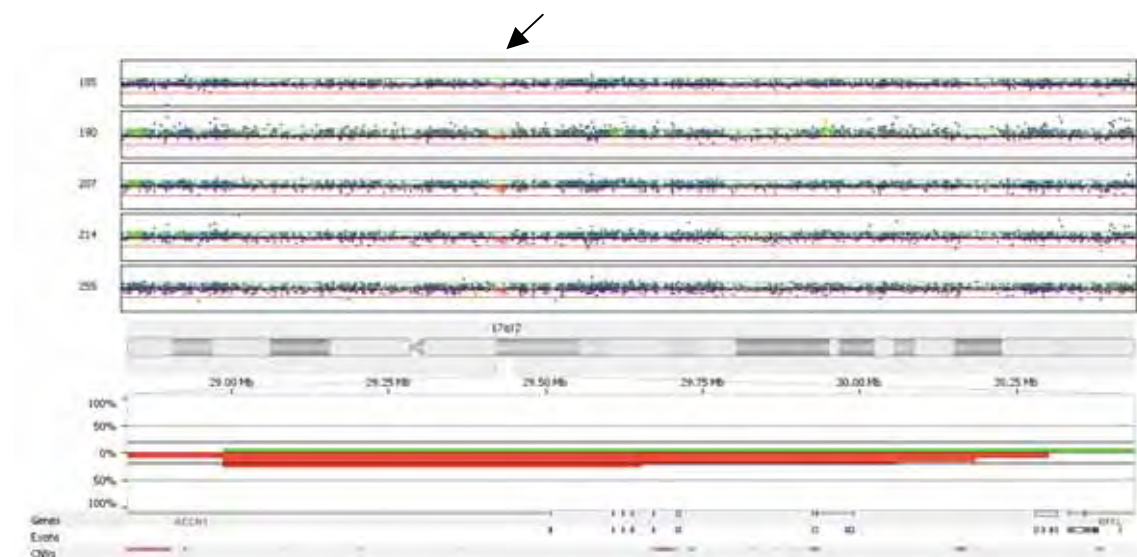
**Anexo 2G.** Ganho em 13q21.31-q21.32.



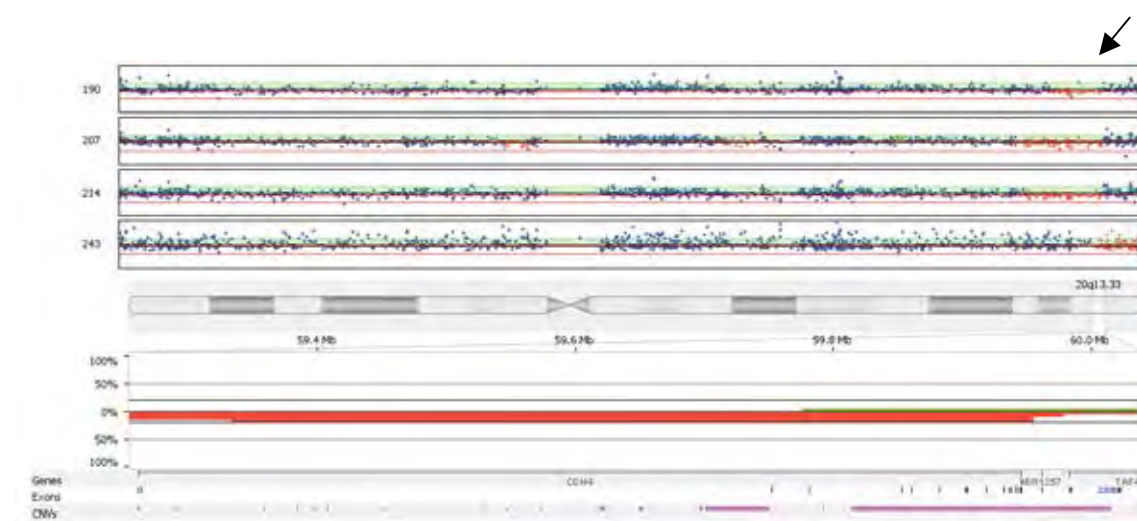
Anexo 2H. Ganho em 14q24.1-q24.2.



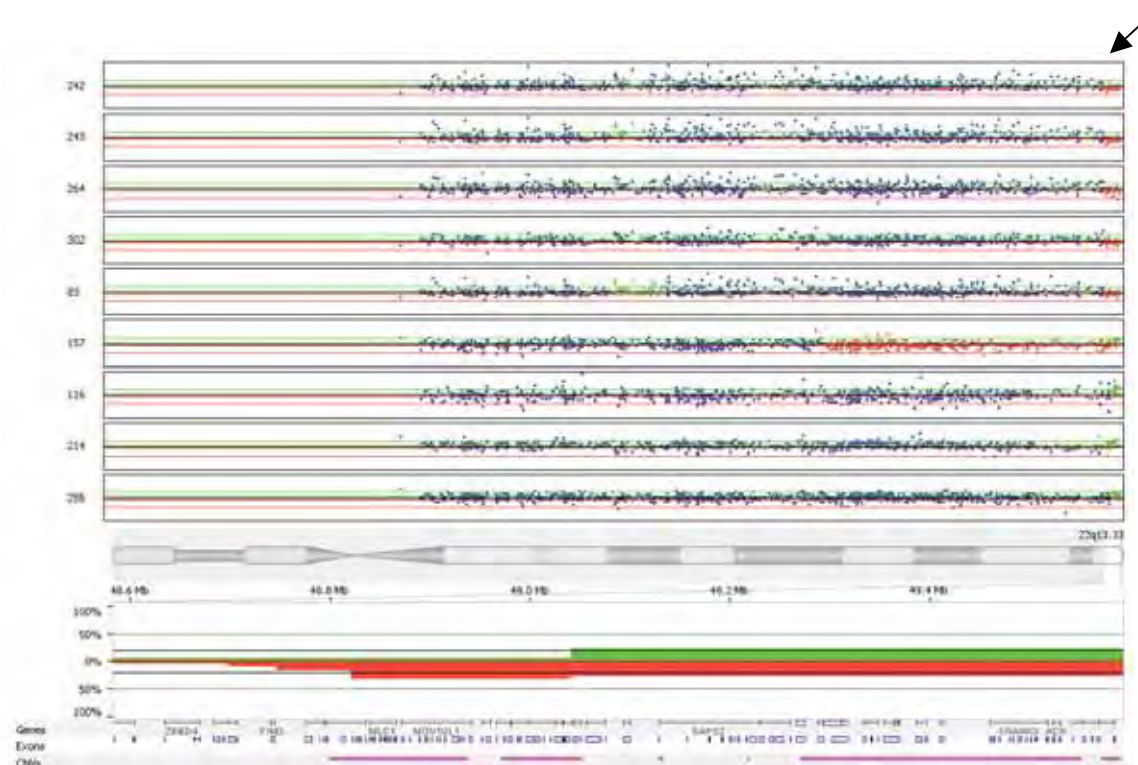
Anexo 2I. Ganho em 17p12-p13.1.



**Anexo 2J.** Perda em 17q12.



**Anexo 2K.** Perda em 20q13.33.



## Anexo 2L. Perdas e ganhos observados em 22q13.33.

## Artigo 1



# **The potential role of stem cells in endometriosis suggested by chromosomal imbalances and stemness-related markers protein expression in lesions from different anatomical sites**

Cássia Gisele Terrassani Silveira<sup>1</sup>, Mauricio Simões Abrão<sup>2</sup>, João Antônio Dias Jr<sup>2,3</sup>, Renata de Almeida Coudry<sup>3</sup>, Sandra Aparecida Drigo<sup>5</sup>, Maria Aparecida Custódio Domingues<sup>6</sup>, Silvia Regina Rogatto<sup>5,7</sup>

<sup>1</sup>*Department of Genetics, Institute of Biosciences, UNESP - Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil;*

<sup>2</sup>*Department of Obstetrics and Gynecology, Sao Paulo University, Sao Paulo, SP, Brazil;*

<sup>3</sup>*Sirio Libanes Hospital, Sao Paulo, Brazil;*

<sup>5</sup>*NeoGene Laboratory, Department of Urology, Faculty of Medicine, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.*

<sup>6</sup>*Department of Pathology, Faculty of Medicine, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.*

<sup>7</sup>*Department of Research - CIPE, Antonio Prudente Foundation, AC Camargo Hospital, Sao Paulo, SP, Brazil.*

## **\* Correspondence to:**

Silvia Regina Rogatto, PhD

NeoGene Laboratory, CIPE - Fundação Antonio Prudente, Hospital AC Camargo, Rua Taguá 440, Liberdade, CEP: 01508-010, São Paulo, Brazil. Fax: +55-11-2189-5163. E-mail: [rogatto@fmb.unesp.br](mailto:rogatto@fmb.unesp.br) or [silvia.rogatto@cipe.accamargo.org.br](mailto:silvia.rogatto@cipe.accamargo.org.br)

**Key words:** endometriosis, high resolution comparative genomic hybridization, chromosomal imbalances, immunohistochemistry, stem cells

**Running Title:** The potential role of stem cell in endometriosis

**Submitted:** Journal of Cellular and Molecular Medicine (FI: 5.228)

**ABSTRACT**

Endometriosis (EDT) is multifactorial gynecological disease characterized by the presence of functional endometrial-like tissue in ectopic sites. Since EDT is increasingly recognized as a major women's health issue, several studies have focused on elucidating its pathogenesis. In this study, High Resolution Comparative Genomic Hybridization (HR-CGH) was applied, in both stromal and epithelial cells of 20 endometriotic lesions derived from eight patients, for screening of genomic imbalances. Eutopic endometrium from three patients was also evaluated and presented normal genomic profiles. In ectopic tissues, an average of 68 genomic imbalances was detected per sample. The comparison between stroma and epithelia showed the prevalence of common genomic alterations. DNA losses were more frequently detected and involved mainly 3p, 5q, 7p, 9p, 11q, 16q, 18q and 19q. Interestingly, the comparison among genomic imbalances of endometriotic lesions from different anatomical sites from the same patient showed a high frequency of common chromosomal alterations. Based on HR-CGH results, it was also evaluated the expression of seven stemness-related markers by immunohistochemistry. Positive immunostaining for CD9, CD34, c-Kit and Oct-4 markers was detected in isolated epithelial and/or stromal cells in majority of cases. The presence of common genomic alterations in stromal and epithelial cells from different anatomical sites and the expression of stemness-related markers suggested that EDT presents a clonal proliferation with the involvement of stem cells.

## INTRODUCTION

Endometriosis (EDT) is a chronic, progressive and complex gynecological disease affecting 6 to 10% of women in reproductive age. The major symptoms include inflammation, severe dysmenorrhoea, dyspareunia, chronic pelvic pain and subfertility [1].

Endometriotic lesions are characterized by the presence of functional endometrial-like tissue (glandular epithelia and/or stroma) outside of the uterine cavity. Although benign, this disease could be invasive and comprise a wide spectrum of ectopic lesions in different sites (mainly in peritoneal cavity, ovary, retrocervical region, bladder, ureter and bowel) varying in severity and histopathologic aspects [2].

It is well known that genetic abnormalities may play a role in EDT development modifying stromal-epithelial interactions, peritoneal environment, immune surveillance, cell adhesion and proliferation, apoptotic process and angiogenic capacity [3,4]. Comparative Genomic Hybridization (CGH) is a molecular cytogenetic tool for screening of chromosomal imbalances [5] which may affect oncogenes and tumor suppressor genes activities. CGH approach has been successfully applied in studies of solid tumors, including ovarian and endometrial carcinomas, but in EDT the data remain controversial [6,7].

In addition to the genetic aspects, an increasingly interest has been given to the potential role of stem cells on EDT development. Stem cells are rare undifferentiated cells virtually present in all adult tissues and organs. These cells retain high proliferative, self-renewal and differentiation potential. The number of stem cells in adult tissues is actively regulated through a strict balance between cell proliferation, differentiation and death [8]. The presence of adult stem cells in endometrium has been reported. Chan et al. [9] described clonogenic stromal and epithelial cells in human endometrium, suggesting the involvement of stem cells. Other studies also suggested the presence of stem cells in endometrium by the label-retaining cell methodology [10,11], investigation of clonogenic

properties [12], differentiation ability [13], and analysis of stemness-related surface cell markers [14,15].

The presence of aberrant stem cells has been associated with the pathogenesis of several tumors and different proliferative disorders in endometrium [16]. Particularly, some evidence have suggested the involvement of endometrial stem cells in EDT development: (1) the monoclonal origin described in endometriotic lesions [17-19]; (2) the possibility of establishing primary cell cultures from cell clones derived of endometriotic lesions [20]; (3) the presence of progenitors cells with high proliferation and differentiation potential in menstrual fluid [21].

In the present study, we successfully combined laser capture microdissection (LCM) in formalin-fixed paraffin-embedded samples (FFPE) and high resolution-CGH (HR-CGH) analysis to identify chromosomal imbalances in stromal and epithelial cells from endometrioid lesions located at different anatomical sites. Based on these findings, a set of stemness-related markers was targeted in the immunohistochemical analysis to investigate the putative role of stem cells in EDT pathogenesis.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Patients and Tissues Specimens**

Ectopic (n=20) and eutopic (n=3) endometrial tissue samples were obtained from eight patients who underwent to laparoscopy at Sirio-Libanês Hospital for diagnostic and treatment purposes. The Human Research Ethics Committee of the institution approved the study. The lesions were morphologically classified according Hoeger and Guzick [22], based on the variations in the ectopic endometrial structures. The endometriotic lesions were derived from different anatomical sites including intestine (n=10), ovary (n=3), bladder (n=3), peritoneum (n=1), intersacral ligament (n=1), Fallopian tube (n=1) and retrocervical region (n=1).

All patients were evaluated for clinical symptoms, CA-125 serum levels and transvaginal and pelvic ultrasonography. The patients were in reproductive or premenopausal age (26 to 43 years). The symptoms reported included dysmenorrhea (moderate to severe) (n=8), infertility (n=6), chronic pelvic pain (n=8) and dyspareunia (n=7). All cases presented disease in stage IV according to the American Society for Reproductive Medicine [23] revised classification of EDT. Clinical information of patients and histopathological characteristics of selected lesions are shown in Table 1.

### **Chromosomal Imbalances Analysis**

Approximately 250 to 2000 endometrial cells were obtained from stromal and epithelial layer by laser capture microdissection (Pix Cell II™ system with CapSure™ Macro LCM caps, Arcturus, Inc., CA, USA). After cell digestion, genomic DNA extraction was obtained using QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, GmbH, Germany). DNA test and reference were amplified and labeled by PCR-based protocols (SCOMP, Single Cell Comparative Genomic Hybridization), as described by Stoecklein et al. [24]. The hybridization and washes were performed as previously described [25]. Chromosomal imbalances were detected by standard reference intervals, as described in Kirchhoff et al [26]. Superposed chromosomes and heterogeneous hybridization patterns were excluded from the analysis. A library with differentially labeled normal samples was constructed to select the upper and lower limits for chromosomal gains and losses (standard reference intervals). The 99.5% confidence interval of each mean ratio profile value was compared to a corresponding 99.5% standard reference interval based on an average of 15 normal DNA samples obtained from health volunteers (140 cells). The standard reference interval was scaled automatically to fit the individual test case. The description of HR-CGH copy number imbalances was based on the ISCN recommendation [27].

### **Immunohistochemistry (IHC)**

To the best of our knowledge, no specific marker has been established for endometrial progenitor cells. Therefore, it was selected markers CD9, CD13, CD24, CD34, CD117/c-kit, CD133 and Oct-4 based on their involvement in stemness preservation [28-33] and their association with mesenchymal-originated cells [34,35].

The protein expression of these seven stemness-related markers (Table 2) was investigated on 17 ectopic and all three eutopic endometrial tissue samples evaluated by HR-CGH. Coated glass slides containing FFPE tissues were constructed with 3mm cross-sections for immunohistochemical staining. Exclusively for CD9 marker, the slides were treated with Tris-EDTA 1mM pH 9.0 buffer for heat induced epitope recovery. After 18 hours of incubation, the sections were washed in PBS (phosphate-buffered saline), followed by antibody detection method based on streptavidin-biotin system (Advance™ HRP Link and HRP Enzyme-Dako, Carpinteria, CA, EUA). Reactions were developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 100 mg % solution (DAB, *Sigma*, D-5637, EUA), and the slides were counter-stained with hematoxylin. Positive and negative controls were included in all assays in accordance with manufacturer's recommendations. The intensity score represented the estimated staining intensity (0: negative; 1: weak; 2: moderate; and 3: strong immunostaining intensity) and extension (1:  $\leq 1/3$ ; 2:  $1/3$  to  $2/3$ ; 3:  $> 2/3$  of the total area). IHC scoring was blinded to the case and its clinical aspects. The reactions were further analyzed according to the location of immunodeposits in both the membrane and cytoplasm.

## RESULTS

The eutopic endometrium specimens (stromal and epithelial cells) showed normal HR-CGH profiles. In contrast, ectopic tissues presented, in average, 68 chromosomal regions involved in gains or losses per lesion. These chromosomal imbalances were neither associated with histological type nor to the site of endometriotic focus.

Chromosomal losses were more frequently detected than chromosomal gains in both, stromal (31 chromosomal regions involved in gains; 45 in losses) and epithelial (11 chromosomal regions involved in gains; 32 in losses) components.

A large number of chromosomal imbalances were detected in more than 40% of cases, in both cell components. The comparison between stromal and epithelial chromosomal profiles showed the prevalence of common genomic alterations (Figure 1; Table 3). DNA losses involved mainly 3p24-p25 (16/20), 5q34 (15/20), 7p14-p21 (15/20), 9p21 (17/20), 11q23-q24 (16/20), 16q22-q23 (16/20), 18q12-q21 (15/20), 18q22-q23 (17/20) and 19q13 (18/20), which were observed in more than 75% of lesions. Common gains were also verified but in lower frequency and involved mainly 1q21-q23 (18/20) and 11q12-q21 (19/20).

Although in lower frequency, each cell component also presented exclusive chromosomal alterations. Stromal cells showed gains on 1p, 2q, 3p, 4q, 5, 6, 8q, 9p, 10p, 12 and X; and losses on 1p, 3q, 4q, 5p, 5q, 8p, 13q, 14q, 19p and X. In endometriotic epithelial cells were detected gains on 4p and losses on 6p and Xq (Figure 1; Table 3).

Endometriotic lesions located at different anatomical sites from the same patient were compared in a subset of patients with multiple lesions (n=6). A high frequency of common chromosomal losses and gains were detected in all cases evaluated. A representative case is shown in Figure 2.

The presence of common genomic alterations in stromal and epithelial cells from different endometriotic sites from the same patient indicated the clonal origin of these lesions and highly suggested the putative role of endometrial stem cells in EDT pathogenesis. To better investigate this hypothesis, stemness-related markers were selected to be evaluated in the same ectopic and eutopic endometrial tissue samples by immunohistochemistry (Table 4).

The protein expression of CD13, CD24 and CD133 markers were negative in all endometriotic and eutopic endometrial tissues evaluated. Particularly, CD13 expression was totally absent in ectopic and eutopic endometrial tissues, although positive membrane immunostaining was observed in positive control samples (data not shown). In contrast to the other markers, positive immunostaining of CD9 and CD34 was significantly detected in the majority of endometriotic lesions as well as in eutopic endometrium. Mild to moderate CD9 immunostaining (score 1 to 2) was observed in all endometriotic lesions evaluated (13/13 samples with appropriate cellular morphology for analysis), with extension varying from 1 to 2. In these samples, CD9 expression was detected on basal cells of glandular epithelia (Figure 3). Only one lesion (case 5-B) presented CD9<sup>+</sup> cells on stromal lymph nodes. Although CD9 staining was usually detected in the cell membrane, the endometriotic epithelium cells also exhibited notable cytoplasmatic immunostaining. Similar expression pattern of CD9 marker was also identified in all eutopic endometrial tissues evaluated, but showing lower intensity on proliferative endometrium (case 7). Positive expression of CD34 was detected in all 16 endometriotic samples and in all three eutopic endometrium specimens (Figure 3C and D). In all endometriotic lesions presenting representative and appropriate epithelial component for IHC analysis (12/12 samples), the CD34 positivity was observed only in rare single cells. In endometriotic stroma, CD34 expression was detected in endothelial cells and showed significant increased vascular density near to endometriotic foci for all specimens (16/16 samples), presenting mild to strong intensity. Similar pattern of CD34 staining was detected in epithelial (3/3 samples) and stromal (2/3 samples) cell components of eutopic endometrium tissue sections. Interestingly, 12 endometriotic lesions and all three eutopic endometrium samples presented CD9<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> cells (Figure 3, A-D).

CD117/c-Kit and Oct-4 expression were evaluated in six and five endometriotic lesions (tissue blocks were exhausted), respectively, and in two eutopic endometrial samples. For CD117/c-Kit, positive membrane and cytoplasmatic immunostaining were

observed in three out of six samples in isolated cells of basal epithelia (score 2 to 3) and rarely in stromal cells (Figure 3, E and F). Nuclear protein expression of Oct-4 was detected in four out of five tissue sections in epithelial component, with moderate to strong immunostaining in basal and apical epithelial layers, and on stromal cells of all five endometriotic samples evaluated (Figure 3, G and H). Three lesions presented positive expression for these two stemness-related markers. In eutopic endometrium, CD117/c-Kit and Oct-4 expression was not observed in any cell component.

## DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study evaluating chromosomal abnormalities in stromal and epithelial cells of endometriotic implants from different anatomical sites of the same patient. By HR-CGH was detected a normal genomic profile in eutopic endometrium samples. In opposite of two reports showing low level of chromosomal alterations by conventional CGH [6,7], it was detected an increased number of chromosomal alterations in both cell components from endometriotic lesions. The data obtained from CGH assays strictly depends on the composition of the selected biological sample and is greatly enhanced by including a preprocessing step, as laser microdissection used in the present study.

In accordance with previous reports [6,36], losses predominated over gains in different lesions suggesting that tumor suppressor genes inactivation is a critical event in EDT pathogenesis. The clustering of particular chromosomal regions indicates a recurrent nonrandom pattern of genomic alterations. Additionally, these chromosomal imbalances were observed in both endometriotic cell components suggesting that the perturbation of stromal-epithelial interactions may play a critical role in EDT development and maintenance. The importance of stromal interactions with epithelial cells is well established in embryonic development and tumorigenesis and it is crucial in regulation of

cell proliferation and maturation [37]. In the female reproductive tract, the direct interactions among stromal and epithelial cells and their microenvironments are essential for cell growth and differentiation in normal and pathological endometrial tissues [38-42].

In general, recurrent chromosomal abnormalities observed in both cell components involved mainly losses at 3p24-p25, 5q34, 7p14-p21, 9p21, 11q23-q24, 16q22-q23, 18q12-q21, 18q22-q23 and 19q13, and gains at 1q21-q23 and 11q12-q21. Particularly, gains at 1q21-q23 (90% of lesions) were previously reported in EDT by conventional CGH analysis [43] and contain interesting genes such as *GIRK3*, *ATF6* and *DUSP12* which have possible roles in promoting cell growth, which makes them potential candidate targets. Indeed, gains at 11q12-q21 may alter expression of *CCND1* [44] and *CCTN* [45] genes, important promoters of cell cycle frequently related to tumor progression.

Losses at 3p24-p25 were also detected in 80% of endometriotic lesions (stromal and epithelial cells) from the different anatomic sites. Putative candidates mapped on 3p involved cell proliferation inhibitors (as *RARB2*, at 3p24.1) and transcriptional regulators (as *PPARG*, at 3p25.1). Particularly, *PPARG* gene is a nuclear receptor that plays role in cell energetic metabolism, apoptosis, angiogenesis, anti-inflammatory response by suppressing or activating the expression of various oncogenes and tumor suppressor genes, respectively [46]. Previously, we reported deletion and low expression levels of *PPARG* as a relevant genetic alteration in primary pediatric myelodysplastic syndrome [47]. Several studies have reported the involvement of *PPARG* gene in endometriotic lesions [48-51] and the potential role of *PPARG* as therapeutic target for EDT [52-54].

Based on linkage, LOH and genome-wide analysis, losses in genomic regions at 5q (75% of lesions), 7p (75%) and 9p (85%) detected in this study have already been associated to EDT susceptibility in other reports [55-57]. In addition, a recent genome-wide study conducted in a large control-case cohort identified a strong association between polymorphic variation (i.e., single nucleotide polymorphism) involving a specific

region at 7p15.2 and EDT patients [58]. Particularly, the associated variants on 7p15.2 are located in an intergenic region containing noncoding RNA sequences, predicted transcripts, regulatory elements and a miRNA. Some known genes are close to this region, including two EDT candidate genes, *HOXA10* and *HOXA11*, encoding members of the homeobox A family of transcription factor that play a role in uterine development [59; 60]. These findings suggest that the alteration on these chromosomal regions may be critical in EDT pathogenesis.

Another interesting region found recurrently deleted in this study is located on 11q23-q24 (80% of lesions). Frequent allelic losses at 11q23-q24 were reported in a wide variety of human cancer [61] and also in EDT [62,63], suggesting that this region may harbor important tumor suppressor genes. *PGR* gene is located on 11q23 and it may be a likely target of the losses observed in endometriotic lesions. Progesterone receptor mediates the physiological effects of progesterone regulating endometrial cell proliferation and apoptosis [64]. PGR is also essential for endometrial receptivity and successful establishment and maintenance of pregnancy [65]. In EDT, reduced PGR activity may lead to attenuated or dysregulated progesterone response and decreased (direct or indirectly) expression of progesterone-responsive genes in eutopic endometrium including *HOX* genes [66] and *HSD17B2*, an encoding gene of the enzyme which metabolizes the biologically potent estrogen to weakly estrogenic estrone [67]. Therefore, *PGR* may be a potential candidate gene for losses at 11q in EDT.

Deletions in 19q13, where *TGFB1* gene is mapped, were also frequently deleted in our series of endometriotic lesions (90% of samples). Similarly, Guo et al. [36] reported deletions on 19q13 in endometriomas using array-CGH. Although some studies reported high levels of TGF- $\beta$ 1 in peritoneal fluid of EDT patients [68,69], other has reported decreased transcript expression levels [70]. These findings suggest that *TGF- $\beta$ 1* inactivation might contribute to EDT development reducing apoptosis and increasing cell proliferation levels.

In addition to elevated frequency of common genomic alterations in endometrial stroma and epithelia from ectopic endometria, it was detected a high frequency of common chromosomal imbalances in lesions from different anatomical sites from each patient. It is well established that similar genomic profile provides a strong evidence for a clonal relationship among multiple lesions. In fact, clonal proliferation is thought to be a remarkable characteristic of human neoplasms [71].

The monoclonal origin of EDT lesions hypothesis has been supported by data generated from studies using large number of samples [17,19,72-78]. In the present study, similar chromosomal imbalances detected in epithelial and stromal cells from different anatomical site strongly suggest the monoclonal origin of endometriotic lesions. Ultimately these findings suggest the putative role of stem cell in EDT development. In combination with the observations that the endometrium contains endometrial progenitor cells [79], it is possible that endometriotic lesions are developed from abnormal endometrium-derived stem cells characterized by an increased capacity to implant and establish themselves in an ectopic tissue. However, there is rare direct evidence for the involvement of endometrial progenitor cells in human EDT pathogenesis.

With the aim to explore the hypothesis regarding to the role of endometrial stem cell in EDT development and progression, it was investigated the expression pattern of stemness-related markers in eutopic and ectopic endometrium tissue samples primarily evaluated by HR-CGH. Since there are no specific known markers for endometrial progenitor stem cells, it was tested markers that are expressed in embryonic and/or adult stem cells. Some of them were also reported in endometrial cell previously [80].

In the present study, immunohistochemical analyzes did not reveal any positive immunostaining for CD13, CD24 and CD133 markers in eutopic and ectopic endometrium sections. The CD13 expression in endometrial progenitor cells remains controversial. Corroborating with our findings, Kato et al. [13] reported the absence of CD13 expression

in immature endometrial cell lineage *in vitro*. In contrast, CD13<sup>+</sup> cells were previously identified in endometrial stroma and epithelia from proliferative and secretory phase of the menstrual cycle [13,35,81]. Recently have been reported that different CD13 monoclonal antibodies stain vessels and stromal cells in distinct patterns [82], which could in part explain the controversial data described in endometrium.

Interestingly, it has been reported an apparent inverse correlation between CD24 and estrogen and progesterone receptor expression [83]. Increased expression of ER was exhaustively described in ectopic and eutopic endometrium from patients with EDT and is considered a critical event in the EDT development [67]. In this context, the absence of CD24<sup>+</sup> cells in endometriotic lesions and eutopic endometrium specimens by immunohistochemistry may be influenced by ER expression in these tissues, suggesting that CD24 may not be an effective stem cell marker for endometriotic lesions.

Similarly, no expression of CD133 marker was detected in ectopic and eutopic endometrium. Discordant expression of CD133 has been observed in cancer stem cells from different tumors [84, 85]. It has been speculated that these membrane glycoprotein may be involved in maintaining stem cell properties, and their loss, perhaps through asymmetric cell division, would be associated to promotion of cell differentiation [86]. Therefore, these findings, in combination to our results, suggest that the use of CD133 as a marker for cancer stem cells should be critically evaluated.

In contrast to other markers cited above, positive expression of CD9 and CD34 were detected mainly in basal cells of glandular epithelia in all endometriotic lesions with representative epithelial component (13 and 12 lesions, respectively) and in all eutopic endometrium tissue samples. Particularly, CD9 is a cell surface glycoprotein expressed on mesenchymal stem cells and glandular epithelial cells throughout the menstrual cycle [35]. Kato et al. [13] also showed positive CD9 expression in endometrial cell progeny that

differentiates into epithelial lineage. Moreover, CD9<sup>+</sup> cells were detected in endometrial progenitor cells isolated from the menstrual fluid [21].

In the present study, CD34 expression was identified in endometrial stroma and in isolated cells of glandular epithelia from EDT lesions as well as in eutopic endometrium sections. CD34 is selectively expressed on human hematopoietic progenitor cells and in endometrial stroma and basal epithelia during to the menstrual cycle [31]. In addition, Cho et al. [31] reported that CD34 co-expressing with others cell surface markers (including c-Kit) in the stroma and basal epithelial layer of endometrium strongly suggest the presence of endometrial progenitors cells which retain the potential for mesenchymal differentiation. Similarly, we also observed the co-expression of CD34 and c-Kit in four endometriotic lesions evaluated for these two markers, reinforcing the role of endometrial stem cells in development and maintenance of EDT implants.

Actually, some studies demonstrated positive c-Kit expression in endometriotic lesions and peritoneal fluid of women with EDT and its association with stem cells involvement. The proto-oncogene c-Kit encodes a tyrosine kinase receptor that interacts with stem cell factor [31]. Its activation is associated with aggressive behavior of both benign and malignant tumors, but there are few data on c-Kit expression in EDT [87]. Recently, it has been demonstrated that ectopic epithelial cells expressed higher levels of c-Kit and Oct-4, supporting the hypothesis that endometriotic lesions have a stem cell origin [88]. It is well known that Oct-4 is a molecular marker for pluripotent cells and plays an essential role in maintaining the undifferentiated state, as characteristic of stem cells [89]. This embryonic transcriptional regulator is expressed in several cancers and it has been found in the epithelial cells of normal endometrium [9,12,13,90,91]. Interestingly, Oct-4 expression was also observed in this study in four distinct endometriotic lesions, including three samples that also expressed c-Kit in stromal and basal epithelial cells. These findings reinforce the stem cell involvement in EDT pathogenesis.

In overall, the findings highlighted the common origin of different endometriotic lesions present in the same patient and the potential role of endometrial progenitor cells in EDT development. Furthermore, HR-CGH analysis of primary endometriotic lesions, in both cell components, revealed recurrent alterations in chromosomal regions of putative proto-oncogenes and/or tumor suppressor genes that may involved in growth and surveillance of ectopic endometrium. These potential genes have been implicated in cell proliferation, apoptosis, inflammatory response as well as stromal-epithelial interactions and associated to a tumor phenotype. This study provides important insights into the EDT pathogenesis.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr. Filomena Marino Carvalho, from Department of Pahtology, São Paulo University, for providing histopatological diagnosis. We acknowledge with appreciation Prof. Dr. Renée Laufer Amorim, Dr. Sabrina D. da Silva, Miriam M. Coelho, Renata C. Bueno, Julia B. H. de Mello and pathology service of A. C. Camargo Hospital for all technical support. We also thank the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

**The authors declare that there are no conflicts of interest.**

## REFERENCES

- [1] **McLeod BS, Retzliff MG.** Epidemiology of endometriosis: an assessment of risk factors. *Clin Obstet Gynecol.* 2010; 53(2):389-96.
- [2] **Giudice LC.** Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med.* 2010; 362(25):2389-98.
- [3] **Viganò P, Somigliana E, Chiodo I, et al.** Molecular mechanisms and biological plausibility underlying the malignant transformation of endometriosis: a critical analysis. *Hum Reprod Update.* 2006; 12:77-89.

- [4] **Silveira CGT, Rogatto SR, Podgaec S, et al.** Recent advances in molecular genetics of endometriosis. *J Endometriosis*. 2009; 1: 9-18.
- [5] **Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al.** Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992; 258:818-21.
- [6] **Gogusev J, Bouquet de Jolinière J, Telvi L, et al.** Detection of DNA copy number changes in human endometriosis by comparative genomic hybridization. *Hum Genet*. 1999; 105:444-51.
- [7] **Mhawech P, Kinkel K, Vlastos G, et al.** Ovarian carcinomas in endometriosis: an immunohistochemical and comparative genomic hybridization study. *Int J Gynecol Pathol*. 2002; 21:401-6.
- [8] **Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM.** Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res*. 2008; 314(9):1937-44.
- [9] **Chan RWS, Schwab KE, Gargett CE.** Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod*. 2004; 70:1738-50.
- [10] **Chan RW, Gargett CE.** Identification of label-retaining cells in mouse endometrium. *Stem Cells*. 2006; 24(6):1529-38.
- [11] **Cervelló I, Martínez-Conejero JA, Horcujadas JA, et al.** Identification, characterization and co-localization of label-retaining cell population in mouse endometrium with typical undifferentiated markers. *Hum Reprod*. 2007; 22(1):45-51.
- [12] **Schwab KE, Chan RWS, Gargett CE.** Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil Steril*. 2005; 84(2):1124-9.
- [13] **Kato K, Yoshimoto M, Kato K, et al.** Characterization of side-population cells in human normal endometrium. *Hum Reprod*. 2007; 22(5):1214-23.
- [14] **Forte A, Schettino MT, Finicelli M, et al.** Expression pattern of stemness-related genes in human endometrial and endometriotic tissues. *Mol Med*. 2009; 15(11-12):392-401.
- [15] **Pacchiarotti A, Caserta D, Sbracia M, et al.** Expression of oct-4 and c-kit antigens in endometriosis. *Fertil Steril*. 2011; 95(3):1171-3.
- [16] **Sasson IE, Taylor HS.** Stem Cells and the Pathogenesis of Endometriosis. *Ann NY Acad Sci*. 2008; 1127:106-15.
- [17] **Jimbo H, Hitomi Y, Yoshikawa H, et al.** Evidence for monoclonal expansion of epithelial cells in ovarian endometrial cysts. *Am J Pathol*. 1997; 150:1173-8.
- [18] **Tamura M, Fukaya T, Murakami T, et al.** Analysis of clonality in human endometriotic cysts based on evaluation of X chromosome inactivation in archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Lab Invest*. 1998; 78(2):213-8.
- [19] **Wu Y, Basir Z, Kajdacsy-Balla A, et al.** Resolution of clonal origins for endometriotic lesions using laser capture microdissection and the human androgen receptor (HUMARA) assay. *Fertil Steril*. 2003; 1:710-7.
- [20] **Tanaka T, Nakajima S, Umesaki N.** Cellular heterogeneity in long-term surviving cells isolated from eutopic endometrial, ovarian endometrioma and adenomyosis tissues. *Oncol Rep*. 2003; 10(5):1155-60.

- [21] **Meng X, Ichim TE, Zhong J, et al.** Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med.* 2007; 5:57.
- [22] **Hoeger KM, Guzick DS.** An update on the classification of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol.* 1999; 42(3):611-9.
- [23] **American Society for Reproductive Medicine (ASRM).** Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril.* 1997; 67:817-21.
- [24] **Stoecklein NH, Erbersdobler A, Schmidt-Kittler O, et al.** SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *Am J Pathol.* 2002; 161:143-51.
- [25] **Ojopi EP, Cavalli LR, Cavalieri LM, et al.** Comparative genomic hybridization analysis of benign and invasive male breast neoplasms. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002; 134(2):123-6.
- [26] **Kirchhoff M, Gerdes T, Rose H, et al.** Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry.* 1998; 31:163-73.
- [27] **Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ.** ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. S. Karger, Basel. 2009.
- [28] **Satterthwaite AB, Burn TC, Le Beau MM, et al.** Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. *Genomics.* 1992; 12(4):788-94.
- [29] **Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al.** AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997; 90(12):5002-12.
- [30] **Belicchi M, Pisati F, Lopa R, et al.** Human skin-derived stem cells migrate throughout forebrain and differentiate into astrocytes after injection into adult mouse brain. *J Neurosci Res.* 2004; 77(4):475-86.
- [31] **Cho NH, Park YK, Kim YT, et al.** Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil Steril.* 2004; 81:403-7.
- [32] **Singh SK, Clarke ID, Hide T, et al.** Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene.* 2004; 23(43):7267-73.
- [33] **Kim K, Park BH, Ihm H, et al.** Expression of stem cell marker CD133 in fetal and adult human kidneys and pauci-immune crescentic glomerulonephritis. *Histol Histopathol.* 2011; 26(2):223-32.
- [34] **Ashmun RA, Look AT.** Metalloprotease activity of CD13/aminopeptidase N on the surface of human myeloid cells. *Blood.* 1990; 75(2):462-9.
- [35] **Park KR, Inoue T, Ueda M, et al.** CD9 is expressed on human endometrial epithelial cells in association with integrins  $\alpha 6$ ,  $\alpha 3$  and  $\beta 1$ . *Mol Human Reprod.* 2000; 6:252-7.
- [36] **Guo SW, Wu Y, Strawn E, et al.** Genomic alterations in the endometrium may be a proximate cause for endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004; 116:89-99.
- [37] **Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL.** Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 2004; 432:332-7.

- [38] **Cooke PS, Uchima FD, Fujii DK, et al.** Restoration of normal morphology and estrogen responsiveness in cultured vaginal and uterine epithelia transplanted with stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(7):2109-13.
- [39] **Donjacour AA, Cunha GR.** Stromal regulation of epithelial function. *Cancer Treat Res.* 1991; 53:335-64.
- [40] **Arnold JT, Kaufman DG, Seppälä M, et al.** Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Hum Rep.* 2001; 16:836-45.
- [41] **Witz CA.** Pathogenesis of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 2002; 53:52-62.
- [42] **Griffith JS, Rodgers AK, Schenken RS.** In Vitro Models to Study the Pathogenesis of Endometriosis. *Reprod Sci.* 2010; 17(1):5-12.
- [43] **Gogusev J, Bouquet de Jolinière J, Telvi L, et al.** Genetic abnormalities detected by comparative genomic hybridization in a human endometriosis-derived cell line. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6:821-7.
- [44] **Hui AB, Or YY, Takano H, et al.** Array-based comparative genomic hybridization analysis identified cyclin D1 as a target oncogene at 11q13.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 2005; 65:8125-33.
- [45] **Ambrosio EP, Rosa FE, Domingues MA, et al.** Cortactin is associated with perineural invasion in the deep invasive front area of laryngeal carcinomas. *Hum Pathol.* 2010. DOI: 10.1016/j.humpath.2010.05.030
- [46] **Bonofiglio D, Aquila S, Catalano S, et al.** Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activates p53 gene promoter binding to the nuclear factor-kappaB sequence in human MCF7 breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 2006; 20(12):3083-92.
- [47] **Silveira CG, Oliveira FM, Valera ET, et al.** New recurrent deletions in the PPARgamma and TP53 genes are associated with childhood myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2009; 33:19-27.
- [48] **Dogan S, Machicao F, Wallwiener D, et al.** Association of peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 Pro-12-Ala polymorphism with endometriosis. *Fertil Steril.* 2004; 81(5):1411-3.
- [49] **Ohama Y, Harada T, Iwabe T, et al.** Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand reduced tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production and growth in endometriotic stromal cells. *Fertil Steril.* 2008; 89(2):311-7.
- [50] **Hwang KR, Choi YM, Kim JM, et al.** Association of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 Pro12Ala polymorphism with advanced-stage endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 64(5):333-8.
- [51] **Sharma I, Dhawan V, Saha SC, et al.** In vitro effects of peroxisome proliferator-activated receptor-γ ligands on gene expression in lipopolysaccharide-induced endometrial and endometriotic stromal cells. *Fertil Steril.* 2011; 95(2):829-31.
- [52] **Lebovic DI, Mwenda JM, Chai DC, et al.** PPAR-gamma receptor ligand induces regression of endometrial explants in baboons: a prospective, randomized, placebo- and drug-controlled study. *Fertil Steril.* 2007; 88:1108-19.

- [53] **Kavoussi SK, Witz CA, Binkley PA, et al.** Peroxisome-proliferator activator receptor-gamma activation decreases attachment of endometrial cells to peritoneal mesothelial cells in an in vitro model of the early endometriotic lesion. *Mol Hum Reprod.* 2009; 15(10):687-92.
- [54] **Lebovic DI, Mwenda JM, Chai DC, et al.** Peroxisome proliferator-activated receptor-(gamma) receptor ligand partially prevents the development of endometrial explants in baboons: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Endocrinology.* 2010; 151(4):1846-52.
- [55] **Bischoff FZ, Simpson JL.** Heritability and molecular genetic studies of endometriosis. *Hum Reprod Update.* 2000; 6:37-44.
- [56] **Zondervan KT, Treolar SA, Lin J, et al.** Significant evidence of one or more susceptibility loci for endometriosis with near-Mendelian inheritance on chromosome 7p13-15. *Hum Rep.* 2007; 33:717-28
- [57] **Uno S, Zembutsu H, Hirasawa A, et al.** A genome-wide association study identifies genetic variants in the CDKN2BAS locus associated with endometriosis in Japanese. *Nat Genet.* 2010; 42(8):707-10.
- [58] **Painter JN, Anderson CA, Nyholt DR, et al.** Genome-wide association study identifies a locus at 7p15.2 associated with endometriosis. *Nat Genet.* 2011; 43(1):51-4.
- [59] **Taylor HS, Bagot C, Kardana A, et al.** HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod.* 1999; 14(5):1328-31.
- [60] **Wu Y, Halverson G, Basir Z, et al.** Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193(2):371-80.
- [61] **Kobayashi H, Kajiwara H, Kanayama S, et al.** Molecular pathogenesis of endometriosis-associated clear cell carcinoma of the ovary (Review). *Oncol Rep.* 2009; 22:233-40.
- [62] **Jiang X, Morland SJ, Hitchcock A, et al.** Allelotyping of endometriosis with adjacent ovarian carcinoma reveals evidence of a common lineage. *Cancer Res.* 1998; 58(8):1707-12.
- [63] **Campbell IG, Thomas EJ.** Endometriosis: candidate genes. *Hum Reprod Update.* 2001; 7:15-20.
- [64] **Mulac-Jericevic B, Conneely OM.** Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction.* 2004; 128(2):139-46.
- [65] **Young SL, Lessey BA.** Progesterone function in human endometrium: clinical perspectives. *Semin Reprod Med.* 2010; 28(1):5-16.
- [66] **Cakmak H, Taylor HS.** Molecular mechanisms of treatment resistance in endometriosis: the role of progesterone-hox gene interactions. *Semin Reprod Med.* 2010; 28(1):69-74.
- [67] **Bulun SE, Cheng YH, Pavone ME, et al.** 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2 deficiency and progesterone resistance in endometriosis. *Semin Reprod Med.* 2010; 28(1):44-50.
- [68] **Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, et al.** Transforming growth factor-beta activity is increased in peritoneal fluid from women with endometriosis. *Obstet Gynecol.* 1994; 83(2):287-92.

- [69] **Küpker W, Schultze-Mosgau A, Diedrich K.** Paracrine changes in the peritoneal environment of women with endometriosis. *Hum Reprod Update.* 1998; 4(5):719-23.
- [70] **Johnson MC, Torres M, Alves A, et al.** Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3:45.
- [71] **Nowell PC.** The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976; 194(4260):23-8.
- [72] **Nilbert M, Pejovic T, Mandahl N, et al.** Monoclonal origin of endometriotic cysts. *Int J Gynecol Cancer.* 1995; 5(1):61-3.
- [73] **Jiang X, Hitchcock A, Bryan EJ, et al.** Microsatellite analysis of endometriosis reveals loss of heterozygosity at candidate ovarian tumor suppressor gene loci. *Cancer Res.* 1996; 56:3534-9.
- [74] **Jimbo H, Hitomi Y, Yoshikawa H, et al.** Clonality analysis of bilateral ovarian endometrial cysts. *Fertil Steril.* 1999; 72(6):1142-3.
- [75] **Tamura M, Fukaya T, Murakami T, et al.** Cytogenetic analysis of cells from endometriotic cysts of the human ovary. *Cancer Genet Cytogenet.* 1998; 102(2):155-7.
- [76] **Mayr D, Amann G, Siefert C, et al.** Does endometriosis really have premalignant potential? A clonal analysis of laser-microdissected tissue. *FASEB J.* 2003; 17(6):693-5.
- [77] **Nabeshima H, Murakami T, Yoshinaga K, et al.** Analysis of the clonality of ectopic glands in peritoneal endometriosis using laser microdissection. *Fertil Steril.* 2003; 80(5):1144-50.
- [78] **Bricou A, Batt RE, Chapron C.** Peritoneal fluid flow influences anatomical distribution of endometriotic lesions: why Sampson seems to be right. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008; 138:127-34.
- [79] **Maruyama T, Masuda H, Ono M, et al.** Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology. *Reproduction.* 2010; 140(1):11-22.
- [80] **Gargett CE, Chan RWS, Schwab KE.** Endometrial stem cells. *Curr Op Obstret Gynecol.* 2007; 19:377-83.
- [81] **Seli E, Senturk L, Bahtiyar OM, et al.** Expression of aminopeptidase N in human endometrium and regulation of its activity by estrogen. *Fertil Steril.* 2001; 75:1172-6.
- [82] **Di Matteo P, Arrigoni GL, Alberici L, et al.** Enhanced expression of CD13 in vessels of inflammatory and neoplastic tissues. *J Histochem Cytochem.* 2011; 59(1):47-59.
- [83] **Kim KH, Choi JS, Kim JM, et al.** Enhanced CD24 expression in endometrial carcinoma and its expression pattern in normal and hyperplastic endometrium. *Histol Histopathol.* 2009; 24(3):309-16.
- [84] **Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B.** The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med.* 2008; 86(9):1025-32.
- [85] **Hermansen SK, Christensen KG, Jensen SS, et al.** Inconsistent immunohistochemical expression patterns of four different CD133 antibody clones in glioblastoma. *J Histochem Cytochem.* 2011; 59(4):391-407.

- [86] **Bauer N, Fonseca AV, Florek M, et al.** New insights into the cell biology of hematopoietic progenitors by studying prominin-1 (CD133). *Cells Tissues Organs*. 2008; 188(1-2):127-38.
- [87] **Ha SA, Kim HK, Yoo J, et al.** Transdifferentiation-inducing HCCR-1 oncogene. *BMC Cell Biol*. 2010; 11:49.
- [88] **Pacchiarotti A, Caserta D, Sbracia M, et al.** M. Expression of oct-4 and c-kit antigens in endometriosis. *Fertil Steril*. 2011; 95(3):1171-3.
- [89] **Matthai C, Horvat R, Noe M, et al.** Oct-4 expression in human endometrium. *Mol Hum Reprod*. 2006; 12:7–10.
- [90] **Lynch L, Golden-Mason L, Eogan M, et al.** Cells with haematopoietic stem cell phenotype in adult human endometrium: relevance to infertility? *Hum Reprod*. 2007; 22:919–26.
- [91] **Du Z, Cong H, Yao Z.** Identification of putative downstream genes of Oct-4 by suppression-subtractive hybridization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 282(3):701-6.

**Table 1.** Clinical information of patients and histopathological characterization of endometriotic lesions by HR-CGH and immunohistochemistry.

| Patients | Age at the surgery | Sites of EDT lesions | Sample IDs           | Histological characteristics of lesions | Depth of the lesions | ASMR stage |
|----------|--------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------------------|----------------------|------------|
| 1        | 39y                | Sigmoid              | 1-S                  | S + E/ DM                               | Infiltrative         | IV         |
|          |                    | Ovary                | 1-O                  | S + E/ DM                               | Superficial          |            |
| 2        | 33y                | Rectosigmoid         | 2-RS                 | S + E/ DM                               | Infiltrative         | IV         |
|          |                    | Bladder              | 2-B                  | S + E/ D                                | Superficial          |            |
|          |                    | Rectal region        | 2-R                  | S + E/ D                                | Superficial          |            |
| 3        | 43y                | Sigmoid              | 3-S                  | S + E/ DM                               | Infiltrative         | IV         |
|          |                    | Ovary                | 3-O                  | S                                       | Superficial          |            |
| 4        | 28y                | Peritoneum           | 4-P                  | S + E/ DM                               | Superficial          | IV         |
| 5        | 26y                | Bladder              | 5-B                  | S                                       | Infiltrative         | IV         |
|          |                    | Sigmoid              | 5-S                  | S + E/ DM                               | Infiltrative         |            |
| 6        | 40y                | Ovary                | 6-O                  | S + E/ DM                               | Superficial          | IV         |
|          |                    | Rectosigmoid         | 6-RS [I, II and III] | S + E/ DM                               | Infiltrative         |            |
|          |                    | [3 distinct foci]    |                      | S + E/ DM                               | Infiltrative         |            |
|          |                    | Intersacral region   | 6-I                  | S + E/ DM                               | Superficial          |            |
| 7        | 31y                | Fallopian tube       | 6-F                  | S + E/ DM                               | Superficial          | IV         |
|          |                    | Rectosigmoid         | 7-RS                 | S + E/ DM                               | Infiltrative         |            |
|          |                    | Bladder              | 7-B                  | S + E/ D                                | Superficial          |            |
| 8        | 33y                | Retrocervical region | 7-RC                 | S + E/ D                                | Superficial          | IV         |
|          |                    | Sigmoid              | 8-S                  | S + E/ DM                               | Infiltrative         |            |

EDT: endometriosis; y: years; S: stromal pattern; E: glandular epithelia; D: differentiated cells; DM: differentiated and undifferentiated cells; ASMR: American Society for Reproductive Medicine.

**Table 2.** Primary antibodies used for immunohistochemistry reactions.

| Antibodies           | Antibody subtype  | Pattern of staining     | Dilution | Manufacturer   |
|----------------------|-------------------|-------------------------|----------|----------------|
| CD9 [clone 72F6]     | Mouse monoclonal  | Cell membrane/cytoplasm | 1:100    | Neomarkers     |
| CD13 [clone 38C12]   | Mouse monoclonal  | Cell membrane           | 1:40     | Neomarkers     |
| CD24 [clone SN3]     | Mouse monoclonal  | Cell membrane           | 1:50     | Neomarkers     |
| CD34 [clone QBEnd10] | Mouse monoclonal  | Cell membrane           | 1:100    | DakoCytomation |
| CD117/c-kit          | Rabbit polyclonal | Cell membrane/cytoplasm | 1:600    | Dako           |
| CD133                | Rabbit polyclonal | Cell membrane           | 1:100    | Abcam          |
| Oct-4                | Mouse monoclonal  | Nucleus                 | 1:150    | Santa Cruz     |

**Table 3.** Genomic alterations [chromosomal gains and losses] detected in stroma and epithelia derived from different endometriotic lesions evaluated by HR-CGH. Chromosomal alterations presented in  $\geq 40\%$  of samples were considered significant. The exclusive regions altered in each component are in bold.

| Alterations   | Stroma                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Epithelia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Gains</b>  | <b>1p12-p21; 1p22;</b> 1q21-q23; 2p11.2-p12; 2q11.2-q13; <b>2q14.1-q14.3;</b> 2q21-q23; <b>2q24; 3p12-p13;</b> 3p14-p21; 3q12-q13.3; <b>4q12-q13; 4q21-q22; 4q24-q26; 4q27-q28; 5p12-p13;</b> 5q11.2-q13; <b>5q14-q21; 6p12-p21.1; 6q12-q15; 6q16-q21;</b> 7q11.2-q22; <b>8q11.2-q13; 9p12-p13; 10p11.2;</b> 11p11.2-p12; 11q12-q13; <b>12p11.2; 12q12-q13; Xp11.2; Xq12-q21</b>                                                                                                                                                                           | 1q21-q24; 2p11.2-p12; 2q11.2-q12; 2q22-q23; 3p21; 3q12-q13.1; <b>4p12-p13;</b> 5q11.2-q13; 7q11.2; 11p11.2-p12; 11q12-q13                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Losses</b> | <b>1p32-p33; 1p34.2-p35;</b> 1p36.1-p36.3; 1q32; 1q41-q44; 2p21-p24; 2q35-q37; 3p23-p26; <b>3q26.3-q29;</b> 4p15.1-p16; <b>4q31.3;</b> 4q32-q35; <b>5p15.1-p15.3; 5q31;</b> 5q32-q35; 6q24-q27; 7p14-p22; 7q32-q36; <b>8p21-p23;</b> 8q23-q24.1; 8q24.2-q24.3; 9p21-p23; 9q31-q34; 10q24-q26; 11q23-q25; 12p12-p13; 12q22-q24.3; 13q22-q31; <b>13q32; 14q24-q32;</b> 15q23-q26; 16p12-p13.3; 16q21-q24; 17q21-q25; 18p11.2-p11.3; 18q12; 18q21-q23; <b>19p13.1-p13.3;</b> 19q13.1-q13.4; 20p11.2-p13; 20q11.2-q13.1; 21q22; 22q12-q13; <b>Xp22.1; Xq27</b> | 1q32-q43; 2p21-p25; 2q35-q36; 3p24-p25; 4p15.3; 4q33; 5q32-q35; <b>6p23;</b> 6q24; 7p14-p21; 7q33-q35; 8q23-q24.3; 9p21-p22; 9q31; 9q34; 10q24-q26; 11q23-q24; 12p12; 12q23-q24.3; 13q21-q22; 15q25; 16p12-p13.2; 16q22-q24; 17q24-q25; 18p11.2-p11.3; 18q12-q21; 18q22-q23; 19q13.1-q13.3; 20p12; 20q13.1-q13.2; 21q22; 22q13; <b>Xq25</b> |

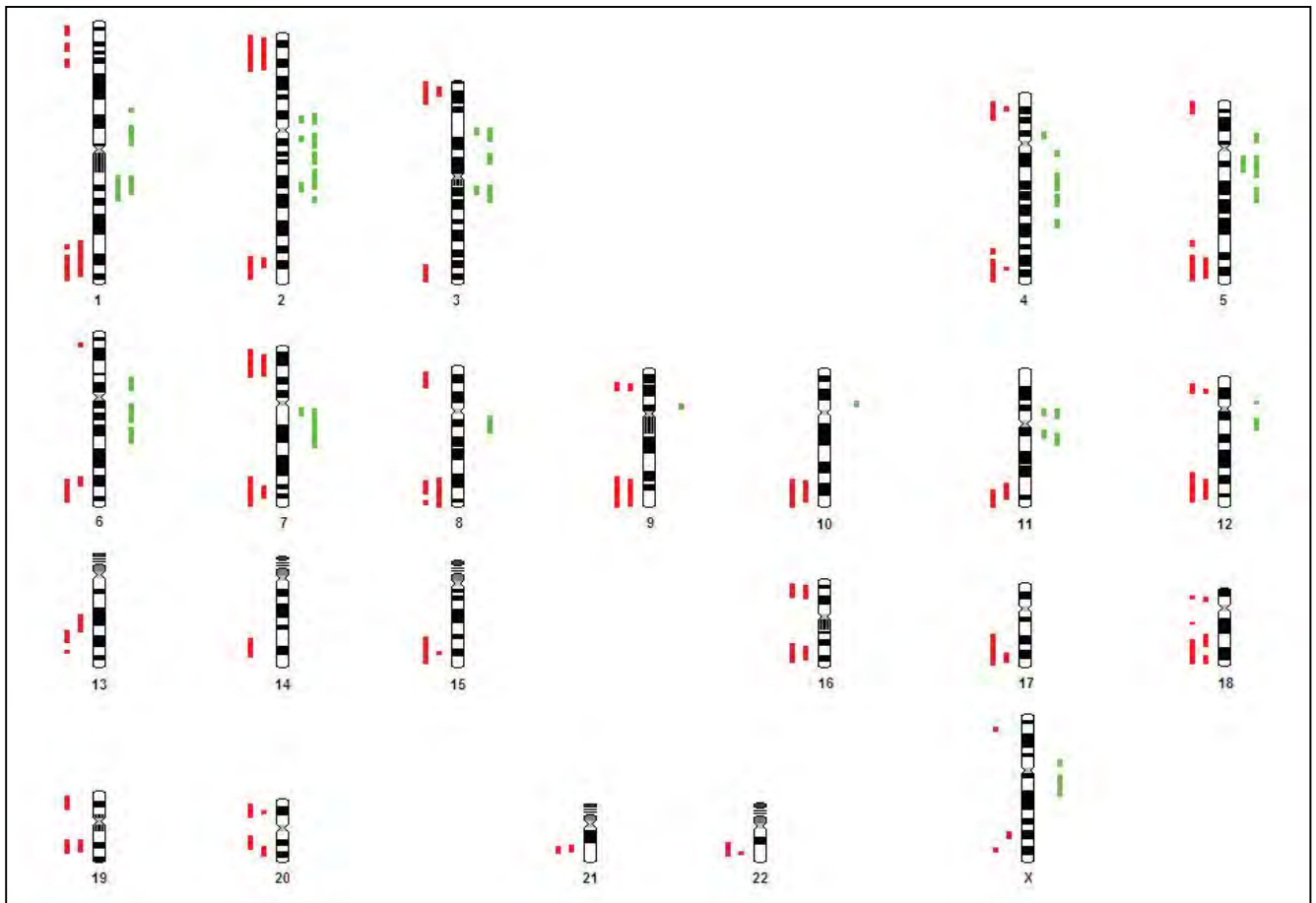


**Figure 1.** Ideogram representative of minimal chromosomal imbalances detected by HR-CGH in stroma and epithelial cells from all endometriotic lesions evaluated. Black vertical bars on the left side indicate losses and the grey bars on the right side show gains. The bars nearest and most distant to each chromosome represent epithelial and stromal cell components, respectively.

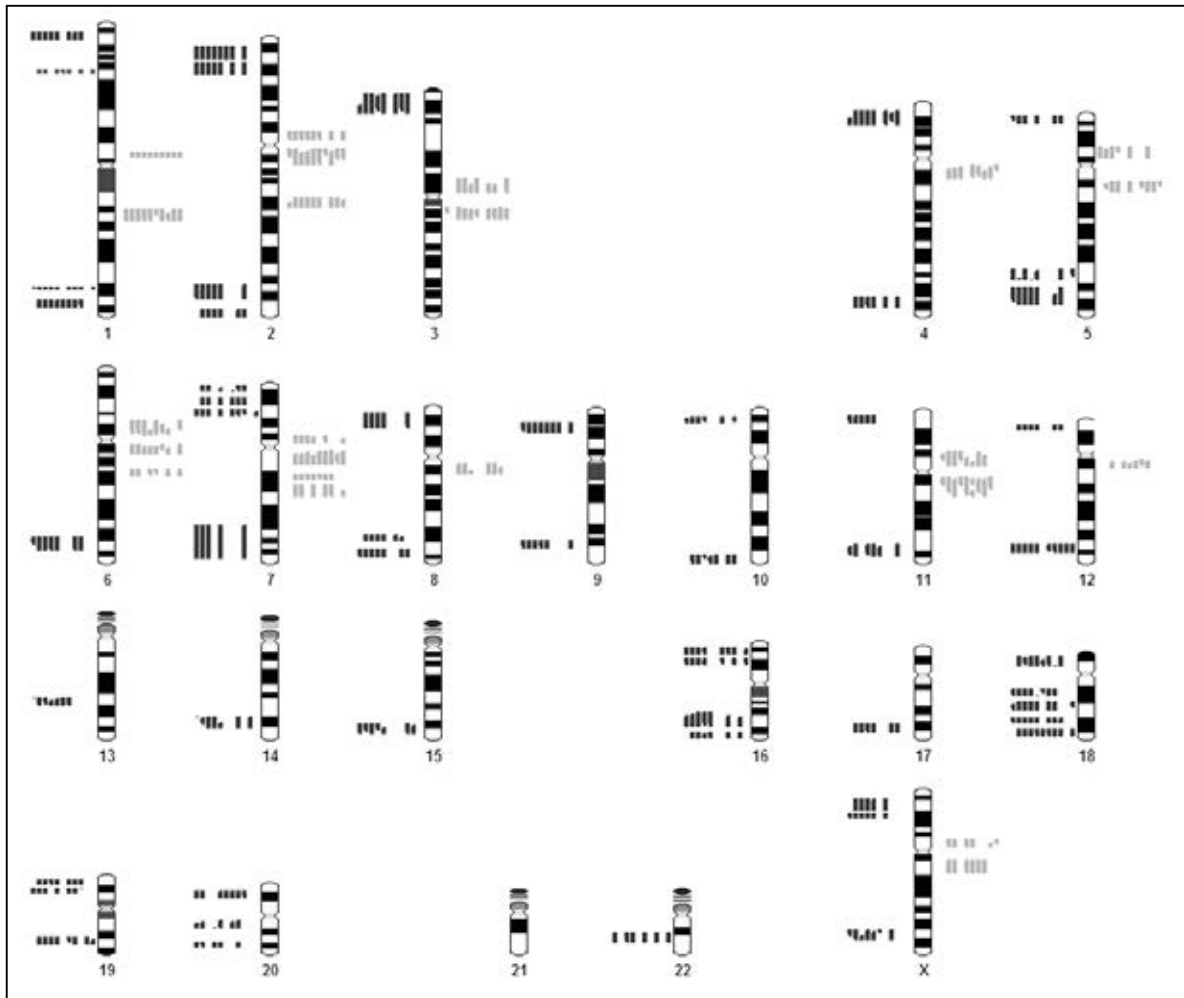


**Figure 2.** Ideogram representative of minimal chromosomal imbalances detected by HR-CGH in stroma and epithelia from distinct endometriotic lesions from case 6. Black vertical bars on the left side indicate losses and the grey bars on the right side show gains. Sample disposal from each chromosome: 6-O stroma, 6-O epithelia, 6-I stroma, 6-I epithelia, 6- PT stroma, 6- PT epithelia, 6-RS-I stroma, 6-RS-I epithelia, 6-RS-II stroma, 6-RS-II epithelia, 6-RS-III stroma and epithelia].

**Table 4.** Expression pattern of stemness-related markers evaluated by IHQ in both cell components of endometriotic lesions [n=20] and eutopic endometrium [n=3] derived from eight patients with EDT [intensity + extension].

| Patients | Sites of EDT lesions     | Antibodies |         |       |     |             |       |       |       |
|----------|--------------------------|------------|---------|-------|-----|-------------|-------|-------|-------|
|          |                          | CD9        |         | CD34  |     | CD117/c-kit |       | Oct-4 |       |
|          |                          | E          | S       | E     | S*  | E           | S     | E     | S     |
| 1        | Sigmoid                  | 1 + 2      | 0       | 1 + 3 | 3   | -           | -     | -     | -     |
|          | Ovary                    | ICM        | ICM     | 1 + 3 | 1   | 0           | 0     | 3 + 2 | 2 + 1 |
| 2        | Rectosigmoid             | ICM        | 0       | 1 + 3 | 1   | 0           | 1 + 1 | 3 + 2 | 2 + 1 |
|          | Bladder                  | 1 + 1      | 0       | 1 + 2 | 3   | -           | -     | -     | -     |
|          | Rectal region            | ICM        | 0       | ICM   | 2   | 0           | 0     | 0     | 1 + 1 |
| 3        | Sigmoid                  | 1 + 2      | 0       | 1 + 3 | 3   | 2 + 2       | 1 + 1 | 3 + 3 | 2 + 3 |
| 5        | Bladder                  | 1 + 3      | 1 + 1** | 1 + 1 | 1   | 2 + 2       | 0     | -     | -     |
|          | Sigmoid                  | 2 + 1      | 0       | 1 + 2 | 3   | -           | -     | -     | -     |
| 6        | Ovary                    | 2 + 1      | 0       | ICM   | ICM | -           | -     | -     | -     |
|          | Rectosigmoid – focus I   | 1 + 1      | 0       | ICM   | 3   | -           | -     | -     | -     |
|          | Rectosigmoid – focus II  | ICM        | ICM     | 3 + 1 | 2   | -           | -     | -     | -     |
|          | Rectosigmoid – focus III | 1 + 2      | 0       | 3 + 2 | 3   | -           | -     | -     | -     |
|          | Intersacral region       | 1 + 1      | 0       | 3 + 2 | 3   | -           | -     | -     | -     |
|          | Fallopian tube           | 2 + 2      | 0       | ICM   | 2   | -           | -     | -     | -     |
|          | Eutopic endometrium      | 2 + 2      | 0       | 3 + 2 | 2   | -           | -     | -     | -     |
|          | Rectosigmoid             | 1 + 2      | 0       | 1 + 3 | 3   | -           | -     | -     | -     |
| 7        | Retrocervical region     | 1 + 1      | 0       | ICM   | 1   | -           | -     | -     | -     |
|          | Eutopic endometrium      | 1 + 1      | 0       | 3 + 3 | 1   | 0           | 0     | 0     | 0     |
| 8        | Sigmoid                  | 2 + 1      | 0       | 2 + 1 | 1   | 2 + 1       | 1 + 1 | 3 + 3 | 2 + 3 |
|          | Eutopic endometrium      | 1 + 2      | 0       | 3 + 3 | 3   | 0           | 0     | 0     | 0     |

\*In this cell component, it was evaluated only CD34 staining intensity; \*\*CD9<sup>+</sup> cells detected in stromal linfonode cells; E: epithelial cells; S: stromal cells; ICM: inappropriate cellular morphology; -: not tested.

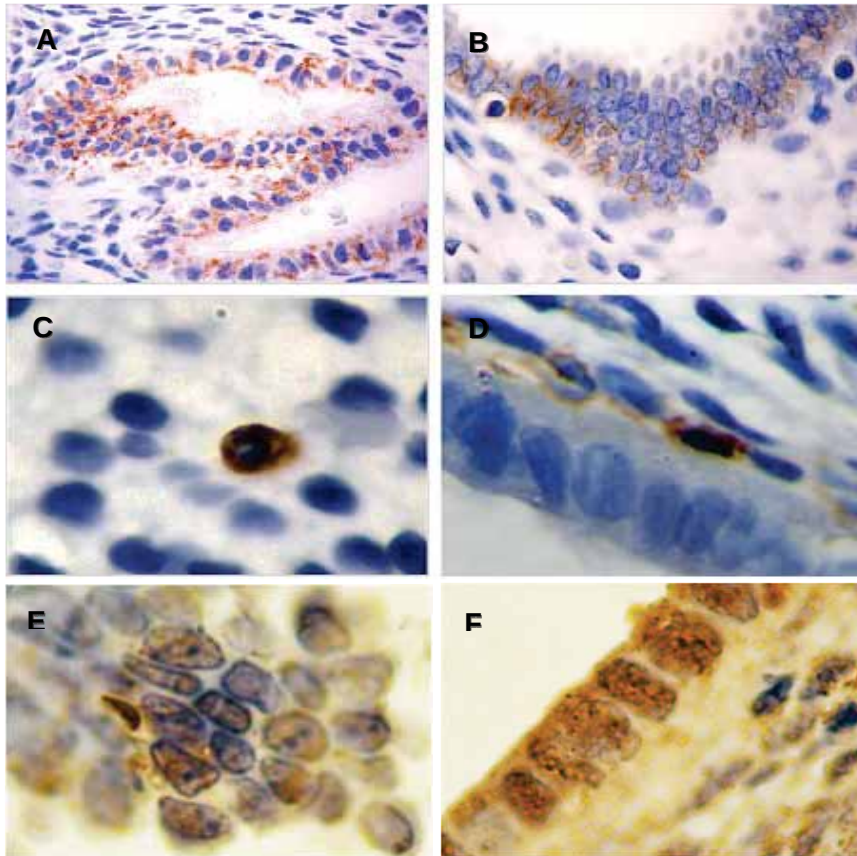


**Figure 3.** Protein expression of CD9, CD34, CD117/c-kit and Oct-4 stemness-related markers detected in stromal and/or epithelial cells of endometriotic lesions, with variable intensity (I) and extension (E) according to the marker and/or lesion. CD9 expression in epithelial layer presenting **(A)** I 2, E 3 (1000x - IMH) and **(B)** I 2, E 2 (1000x - IHM). Isolated CD34<sup>+</sup> cells **(C)** in stroma (1000x - IMH) and **(D)** in basal layer of glandular epithelia (1000x- IMH). **(E)** Nuclear expression of Oct-4 in stromal cells, I 2, E 3 (1000x - IMH). **(F)** Nuclear and cytoplasmic expression of CD117/c-kit in epithelial layer, I 2, E 2 (1000x - IMH).

## **Genomic imbalances on 22q13.33 define two biological routes in intestinal deep endometriosis by array-based CGH**

Cássia Gisele Terrassani Silveira<sup>1</sup>, Mauricio Simões Abrão<sup>2</sup>, Sérgio Podgaec<sup>2</sup>, Renée Laufer Amorim<sup>3,4</sup>, Maria Aparecida Custódio Domingues<sup>5</sup>, Sandra Aparecida Drigo<sup>4,6</sup>, ,  
Silvia Regina Rogatto<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>*Department of Genetics, Institute of Biosciences, UNESP - Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil;*

<sup>2</sup>*Department of Obstetrics and Gynecology, Sao Paulo University, Sao Paulo, SP, Brazil;*

<sup>3</sup>*Veterinary Pathology Service, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu, Sao Paulo, Brazil;*

<sup>4</sup>*NeoGene Laboratory, Department of Urology, Faculty of Medicine, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.*

<sup>5</sup>*Department of Pathology, Faculty of Medicine, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.*

<sup>6</sup>*Departament of Research – CIPE, Antonio Prudente Foundation, AC Camargo Hospital, Sao Paulo, SP, Brazil.*

### **\* Correspondence to:**

Silvia Regina Rogatto, PhD

NeoGene Laboratory, CIPE - Fundação Antonio Prudente, Hospital AC Camargo, Rua Taguá 440, Liberdade, CEP: 01508-010, São Paulo, Brazil. Fax: +55-11-2189-5163. E-mail: [rogatto@fmb.unesp.br](mailto:rogatto@fmb.unesp.br) or [silvia.rogatto@cipe.accamargo.org.br](mailto:silvia.rogatto@cipe.accamargo.org.br)

**Key words:** endometriosis, array-based comparative genomic hybridization, molecular markers, intestinal endometriosis, invasiveness.

**Running Title:** Genomic imbalances in intestinal deep endometriosis

**Submitted:** Fertil Steril FI 3.961

**ABSTRACT**

Deep infiltrating endometriosis (DIE) presented aggressive behavior and may involve different anatomical sites including intestinal wall. Array-based comparative genomic hybridization (aCGH) was applied in endometrial ectopic intestinal lesions from 18 patients with the aim to identify molecular markers. Genomic alterations were observed in all cases and included gains at 3p14.3, 5q32-q33.1, 6q16.3-q21, 10q22.3, 13q21.31-q21.32, 14q24.1-q24.2, 17p12-p13.1 and 22q13.33; and losses at 10q26.3, 11q21, 17q12, 20q13.33 and 22q13.33. Unsupervised hierarchical clustering revealed two major groups based genomic imbalances on 22q13.33 ( $P=0.008$ ), which presented gain at cluster 1 and loss at cluster 2. These clusters were associated with different signaling pathways suggesting the presence of distinct biological routes related to intestinal DIE pathogenesis. Significant genes were mainly related to cell signaling, and cellular development, maintenance and motility. The associated canonical pathways included integrin-linked kinase (ILK), chemokine and interleukine 17 (IL-17) signaling. Additionally, cell proliferation and motility and inflammatory response were found as significant gene networks. To the best of our knowledge, this is the first genome-wide study in intestinal DIE. The findings revealed different biological routes in these lesions suggesting two different molecular events associated with DIE development.

Key words: deeply infiltrating endometriosis, array-CGH, functional analysis

## INTRODUCTION

Deeply infiltrating endometriosis (DIE) is a specific entity histologically defined by the presence lesions that invade more than 5 mm underneath the peritoneal surface (1, 2). Approximately 20% of women with EDT showed DIE and the patients usually presented pelvic pain whose severity is strongly correlated with the depth of lesion (2, 3). DIE with colorectal involvement has received a significant attention because the severe intestinal symptoms-associated that includes haematochezia and dyschezia, and usually requires intensive treatment (4). Indeed, malignant change in colonic EDT has been documented (5), but the rate of progression is still unknown.

It is typically multifocal and comprises rectovaginal lesions as well as infiltrative implants involving vital structures such as bowel, ureters and bladder, which might greatly alter the quality of life (6). Moreover, surgical treatment is frequently associated with recurrence of symptoms and implies the need of long-term therapies (7).

The pathogenic mechanisms underlying DIE development and progression are incompletely elucidated. Based on anatomical distribution of the lesions in peritoneal cavity, a large observational study strongly implicates the retrograde menstruation theory and the importance of peritoneal flow patterns in DIE pathogenesis (6). It has been suggested that deep endometriotic lesion origin is usually associated to a permanent pelvic inflammatory status and formation of progressively worse adhesions (8). However, there are a few reports concerning the molecular genetic alterations related to infiltrating endometriotic lesions.

Understanding of genomic alterations in DIE could be an interesting approach to identify genes and biological processes that lead to progressive injury expansion and anatomical distortion. In this context, high-density oligonucleotide microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH) may provide DNA copy number variations (CNVs) at high-resolution allowing the mapping of these regions. Functional CNVs are

associated with gene dosage alteration, which is a common mechanism for activation or attenuation of oncogenes and tumor suppressor genes, respectively. Moreover, CNVs have demonstrated potential predictive and prognostic value in several diseases and could contribute to identify molecular markers in EDT. To the best of our knowledge, this is the first study evaluating genomic alterations in intestinal DIE by aCGH. Here, we described molecular events and particular gene networks that can be useful to define molecular markers and target therapies for deep endometriotic lesions.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Patients and Tissues Specimens**

Eighteen intestinal DIE lesions were obtained from Sírío-Libanês Hospital, São Paulo, Brazil. All patients were advised of the procedures and provided written informed consent approved by the Institution Ethics Committee. All fresh frozen tissue samples were morphologically classified based on the variations in the ectopic endometrial structures (9).

The patients were clinically evaluated, and both CA-125 serum levels and transvaginal/pelvic sonography were tested. The age of patients ranged from 23 to 58 years old and all of them were symptomatic. The main reported symptoms included dysmenorrhea (moderate to severe), infertility, acyclic pelvic pain, intestinal alterations and dyspareunia. EDT was staged into I-IV according the revised classification of EDT of the American Society for Reproductive Medicine (10) (Table 1).

### **Methods**

Genomic DNA was extracted from endometriotic tissues obtained after microdissection as described by Pires et al. (11). Slides were obtained for each case. After the microdissection, tissue removal of endometriotic foci was confirmed in hematoxylin-eosin slides. Purified genomic DNA was obtained after digestion with proteinase K (100 µg/ml, Invitrogen, CA), extraction by phenol/chloroform, RNase treatment (40 mg/mL, Epicentre Technology, Madison, USA), ethanol precipitation.

Genomic copy number variations were investigated by aCGH using a 4x44k human genome-wide array platform (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Array hybridization was performed according to the manufacturer's recommended protocols using a female commercial genomic DNA (Promega, USA) as reference. After digestion with *AluI* and *RsaI*, test and reference DNA were fluorescently labeled by BlueGnome Fluorescence Labelling kit (BlueGnome Ltd, Cambridge). After slides scanning (Agilent scanner at 5 µm resolution), the array data was extracted using the default CGH settings of the Agilent Feature Extraction Software.

Nexus Copy Number software (v. 5.0, Biodiscovery, Inc., CA, USA,) with a sensitivity threshold of 1.00E-4 and the Rank segmentation algorithm was used for detecting regions of statistically significant copy number changes (12). Thresholds of log<sub>2</sub> ratio values for gains and losses were 0.2 and -0.2, respectively; the thresholds for high copy number gain and homozygous deletion were 3.0 and -1.0, respectively. It was used a comprehensive approach for interpreting the aCGH, including the CNVs size (i.e., involving ≥ 3 consecutive altered probes) and gene content of CNVs. It was excluded recurrent CNVs found in more than 5% of reference dataset (82 Brazilian health women, data unpublished). The significant alterations were also compared with the Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation>, March 2011). Hierarchical clustering analysis was performed using Complete Linkage Hierarchical algorithm. It was

considered as significant the recurrent alterations found in more than 20% of the samples ( $P < 0.05$ ).

Statistically significant pathways and function as well as the networks including the most relevant genes involved in CNV were investigated using the Ingenuity Pathway Analysis software (IPA, Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA) by uploading the Agilent probe set identifiers. Networks were generated based on Ingenuity Pathways Knowledge Database. Fischer's exact test was used to identify the significant functions, networks and pathways represented within the respective gene sets. As result, it is displayed a score  $-\log(P\text{-value})$  that represents the probability of finding genes in networks and pathways relative to other genes, assembled them into specific network/pathways based on random chance.

## RESULTS

Array-based CGH analysis in DIE samples revealed a total of 585 CNVs ( $32.5 \pm 22.9$  alterations per case) comprising all lesions and all chromosomes. Gains were more frequently detected ( $n=316$ ), followed by losses ( $n=249$ ) and amplifications ( $n=20$ ) (Figure 1A). Genomic gains and amplifications were frequently detected on chromosomes 1, 2 and 16 (23, 25 and 23 events, respectively) while heterozygous losses involved mainly in chromosome 1 (26 events). Particularly, novel cryptic CNVs were detected including recurrent gains at 3p14.3, 5q32-q33.1, 6q16.3-q21 and 22q13.33 (4/18 cases), 10q22.3, 13q21.31-q21.32, 14q24.1-q24.2 and 17p12-p13.1 (5/18 cases), as well as genomic losses at 10q26.3 and 20q13.33 (4/18 cases), 11q21 and 17q12 (5/18 cases), and 22q13.33 (6/18 cases) (Figure 1B). These recurrent alterations consisted of genomic regions with 0.62 to 4.2 Mb containing a restricted number of genes ( $< 20$  genes per region). In total, it was verified 137 overrepresented sequences and 85 underrepresented

genes. In particular, two chromosomal regions presented alterations involving a unique gene: 17q12 loss (*PCDH9*) and 13q21.31-q21.32 gain (*CDH4*). The detailed information of recurrent CNVs is summarized in Supplement 1.

Unsupervised hierarchical clustering analysis based on the genomic alteration profile identified two main clusters with seven (cluster 1) and eleven cases (cluster 2) (Figura 2A). They were grouped according 25 genes ( $P=0.008$ ; *start*: 49.041.686 and *end*: 49.691.432) mapped on 22q13.33 (gains: cluster 1 or losses: cluster 2) (Figure 2C). The cluster 1 presented higher number of CNVs as well as recurrent chromosomal alterations (22 CNVs) ( $P<0.05$  and  $\geq 20\%$  of lesions) in comparison with cluster 2 (4 CNVs) (Figure 2B). None statistically significant association was found with clinical and pathological features between these clusters.

Eight networks were functionally altered by IPA analysis. Two of them presented a highest number of molecules and were associated with immune cell trafficking and inflammatory response, and cellular development, growth and proliferation (27 and 9 altered genes, respectively) (Figure 3). Biofunctions associated with recurrent genes of the set list included cell morphology and signaling, cellular development, movement, function and maintenance. The genomic alterations were also correlated with physiological system development and diseases involving mainly hematological system and lymphoid tissue development, gastrointestinal and inflammatory disease and genetic disorders. Common biological processes were verified in both clusters and involved apoptosis, cellular development, movement, growth and proliferation, lipid and acid nucleic metabolisms, cell signaling, cell-to-cell interaction, cellular assembly and organization, DNA replication, recombination and repair, gene expression regulation, cell morphology and cellular function and maintenance. A representative number of cellular processes was altered exclusively at cluster 1 and included antigen presentation, cell

cycle, cellular compromise, drug and energy metabolisms as well as RNA post-transcriptional and post-translational modification (Figure 2D).

More than 100 canonical pathways were revealed according to IPA analysis, five of them showed significant association. The most relevant signaling pathways were related to *ILK* (*MAP2K4/JNK*, *MAPK12*, *MYH1*, *MYH2*, *MYH3*, *MYH4*, *MYH8*, *MYH13* and *PPP2R2B/PP2A*), *chemokines* (*CCL2/MCP-1*, *CCL7/MCP-3*, *CCL11/EOTAXIN*, *CCL4/MCP-4*, *MAPK11* and *MAPK12*) and *IL-17* (*CCL2/MCP-1*, *CCL11/EOTAXIN*, *MAP2K4/JNK*, *MAPK11* and *MAPK12*) (P-value of 2,67E-07, 1,9E-06 and 3,06E-05, respectively).

## DISCUSSION

The aCGH data revealed a high number of genomic alterations strengthening the existence of chromosomal instability in deep EDT. To date, only two aCGH studies have been published in EDT with conflicting results. Using BAC arrays, Guo et al (13) showed a substantial number of genomic changes in microdissected ovarian endometriomas and non-infiltrating peritoneal lesions. On the other hand, Zakafras et al. (14) did not detect any alteration in ten advanced ovarian EDT. In particular, the absence of genomic imbalances reported by Zakafras et al. (14) might lead to speculation about the genetic background heterogeneity among patients and the minimal malignant potential of EDT. However, it must be considered that such conclusions have been based on non-microdissected samples. The significance of data obtained from aCGH assays strongly depends on the composition of the selected biological sample and is greatly enhanced by including a preprocessing step (tissue microdissection) that allows the researcher to distinguish the interested cell populations from surrounding undesired material.

Genomic gain regions were more frequently detected than losses pointing towards a relevant role for proto-oncogenes activation in DIE pathogenesis. In contrast, two genome screening studies in non-infiltrating endometriotic lesions using chromosomal CGH (15) and BAC-based aCGH (13) have reported that losses notably predominated over gains. Similar to several tumors, the involvement of oncogenes in invasiveness process (16, 17) might be also associated with deeply infiltrating EDT.

In addition to some novel critical CNV regions found in this study, previous reports using chromosomal CGH (15, 18), aCGH (13) and allelotyping analysis (reviewed in 19) revealed a partial similarity with the present findings. For example, in ovarian and peritoneal EDT, Guo et al. (13) reported gains on 3p14. Recurrent losses on 10q26.3 identified in our DIE series were previously associated with risk of EDT in Australian and European women (20) and was related to progression in endometrial carcinomas (21).

Recurrent genomic imbalances (gains on 3p, 5q, 6q, 10q, 13q, 14q, 17p and 22q and losses on 10q, 11q, 17q, 20q and 22q) varied in size (0.62 to 4.2 Mb) and did not overlapped with common CNVs found in reference Brazilian women health dataset (data unpublished). Particularly, gain at 13q21.31-q21.32 and loss at 20q13.33 involved single genes, *PCDH9* and *CDH4*, respectively. Interestingly, these genes play important roles in cell adhesion regulation and cell-cell communication. Adhesion molecules have been involved in EDT pathogenesis, mainly associated to invasiveness and metastatic potential of endometriotic cells (22). Loss on 11q21, involving *PIWIL4*, was detected in 30% of cases. Recently, this putative transcriptional regulation factor was reported in advanced-stage colon carcinoma and was also associated with invasiveness (23). In overall these data suggest that aCGH is a powerful tool for detection of genomic alterations associated with DIE allowing the identification of molecular markers useful to diagnosis and treatment.

Unsupervised hierarchical clustering analysis identified two major subgroups of DIE characterized by distinct patterns of genomic alterations. Overall, cluster 1 presented higher number of genomic imbalances than cluster 2. In addition, gains on 22q13.33 ( $P=0.008$ ) were detected in cluster 1 and losses in cluster 2 involving the same gene sequences. Although there was noticeable dissimilarity in the genomic architectural profiles and molecular alteration in these DIE cases, no significant differences in clinical outcomes and histopathological data were found between clusters 1 and 2. These findings strongly suggest the existence of distinct molecular events involved in DIE pathogenesis independently of clinical and histological parameters. However, long-term follow up of these patients could define the exact meaning of the distinct genomic imbalances apparently without clinical significance.

In this study, the functional analysis detected CNVs in genes mainly involved in cell motility, development and surveillance, apoptosis, inflammatory response and cell-to-cell interaction. Similarly, a genome-wide expression analysis had also demonstrated alterations in a subset of genes involved in these cellular processes in EDT (22). The functional analysis also indicated that several pathways and specific genes might be disrupted by CNVs in infiltrating endometriotic lesions. Three relevant canonical pathways were associated to DIE development and included integrin-linked kinase (*ILK*), interleukine 17 (*IL-17*) and chemokine signaling.

ILK is a kinase protein that interacts with cytoplasmatic integrins, and growth factors in downstream signaling pathway, leading to the regulation of diverse processes as cell cycle progression, survival and division (24, 25, 26, 27). In addition, ILK couples to transcription factors and other kinase proteins to promote extra and intracellular signaling related to cell migration, angiogenesis, tissue invasion (28) and epithelial-mesenchymal interaction (29). The ILK pathway included nine genes altered by aCGH, involved in gains at 17p12-p13.1 (*JNK/MAP2K4*) and at 22q13.33 (*MAPK12/P38MAPK*). High expression

levels of JNK and MAPK12 *in vivo* (30) and *in vitro* (31) have been reported in EDT progression contributing equally to enhance the inflammatory response in these lesions. These findings suggested the potential of JNK and MAPK12 as molecular target to therapy in DIE.

In addition to ILK pathway, activated IL-17R enhances signaling pathways such as MAPK pathways (including JNK, MAPK12, as well as MAPK11) leading to the induction of proinflammatory cytokines, chemokines and matrix metalloproteinases (32, 33), which are extensively associated to invasiveness and matrix extracellular degradation in EDT (34, 35).

Chemokines coordinates directly inflammatory response through the interaction with a distinct subfamily of G protein-coupled receptors. An important cluster of proinflammatory CCL chemokine genes is located in a 2-0.6 Mb interval at 17q11.2-q12 (36) which was found involved in losses in our DIE series (exclusively in samples from cluster 1). It has been well established that proinflammatory chemokines are secreted by activated T cells and induce leukocytes recruitment to lesion site. High levels of CCL have been reported in peritoneal fluid (37) and peripheral blood (38) of women with EDT. A question may arise concerning the origin of proinflammatory chemokines in EDT. In EDT, macrophages produce and secrete chemokines as well as cytokines and growth factors, which are believed to contribute significantly to the pathogenesis of the disease (39). In contrast, endometrial fragments, when misplaced into mouse pelvic cavity, may secrete proinflammatory proteins inducing a local inflammatory response that further facilitates the endometriotic cell invasion and promotes disease progression (40, 41).

In our analysis, loss of CCL-encoding genes was a recurrent alteration in DIE lesions from cluster 1. Functional analysis revealed that altered chemokine signaling pathways also included gains involving JNK and MAPK12 genes suggesting that distinct biological events might induce inflammatory response by endometriotic cells. In fact, the

chemokine pathway involves a wide family of proinflammatory cytokines and their effects signaled through G protein-coupled receptors are relatively non-selective in ligand binding site (42). As a result of this promiscuity, many chemokine receptors may bind more than one chemokine with high affinity. Thus, although we found loss in regions where is mapped some chemokines (such as *CCL2/ MCP-1*) in endometriotic cells, the chemokine signaling pathway could be alternatively activated by *MAPK11* and *MAPK12*, which were also reported by Borroni et al. (43), or remain activated by other chemokines.

Genomic alterations involved also fifteen genes associated with immune response. Few genes were central in this network, including *MAP2K4* and *WNT5A*. The pivotal gene in this network is *TNF* that interact with nine genes also involved in genomic imbalances such as *MAP2K4*, *WNT5A*, *SCO2*, *TYMP*, and *CCL*. *TNF* have been strongly implicated as potential mediator of the phosphorylation and activation of *MAP2K4* and *MAPK12* in endometriotic cells (30, 31).

Cell development and proliferation network showed all genes in peripheral position interacting directly or indirectly with the central gene *ER1*, which has been reported as involved in endometriotic lesions etiology. EDT is an estrogen-dependent disease in which the growth of endometrial cells is stimulated by estrogen, mainly through the activation of *ER1* (44). However, *ER1* levels have also been shown decreased in some endometriotic lesions including ovarian and peritoneal EDT (22, reviewed in 45). Our analysis revealed that *ER1* interacts directly with three genes involved in gains, including *MAPK12*, which is implicated on cell cycle progression. In agreement with previous studies, copy number alterations in *ER1* downstream genes could contribute for proliferative effects exerted by estrogen pathway, including the activation of *MAPK* pathway (44, 46).

In overall, we indicate putative molecular markers and pathways involved in deep EDT development. These data revealed genomic imbalances involving genes associated

with invasiveness and immune response that can be useful to define clinical strategies to treatment after further studies to confirm these findings.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support. We also thank Ana Carolina Machado Poppe for technical support and Annacarolina F. L. da Silva for helping with pathological analysis.

**The authors declare that there are no conflicts of interest.**

## **REFERENCES**

1. Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril* 1990;53:978-83.
2. Koninckx PR, Meuleman C, Demeyere S, Lesaffre E, Cornillie FJ. Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. *Fertil Steril* 1991;55:759-65.
3. Chapron C, Chopin N, Borghese B, Malartic C, Decuypere F, Foulot H. Surgical management of deeply infiltrating endometriosis: an update. *Ann NY Acad Sci* 2004;1034: 326–337.
4. Koga K, Osuka Y, Yano T, Momoeda M, Yoshino O, Hirota Y, et al. Characterist images of deeply infiltrating rectosigmoid endometriosis on transvaginal and transrectal ultrasonography. *Hum Reprod* 2003;18: 1328-33.

5. Kawate S, Takeyoshi I, Ikota H, Numaga Y, Sunose Y, Morishita Y. Endometrioid adenocarcinoma arising from endometriosis of the mesenterium of the sigmoid colon. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35: 154-7.
6. Chapron C, Chopin N, Borghese B, Foulot H, Dousset B, Vacher-Lavenu MC, et al. Deeply infiltrating endometriosis: pathogenetic implications of the anatomical distribution. *Hum Reprod* 2006;21: 1839-45.
7. Giudice LC. Clinical Practice. Endometriosis. *N Engl J Med* 2010; 362: 2389-98.
8. Vercellini P, Carmignani L, Rubino T, Barbara G, Abbiati A, Fedele L. Surgery for deep endometriosis: a pathogenesis-oriented approach. *Gynecol Obstet Invest* 2009;68: 88-103.
9. Hoeger KM, Guzick DS. An update on the classification of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 1999;42: 611-9.
10. American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997; 67:817-21.
11. Pires ARC, Andreiuolo FM, de Souza SR. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built-needles. *Diag Pathol* 2006; 1:14-8.
12. Olshen AB, Venkatraman ES, Lucito R, Wigler M. Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostatistics* 2004; 5(4):557-72.
13. Guo SW, Wu Y, Strawn E, Basir Z, Wang Y, Halverson G, et al. Genomic alterations in the endometrium may be a proximate cause for endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;116:89-99.

14. Zafrakas M, Tarlatzis BC, Streichert T, Pournaropoulos F, Wöfle U, Smeets SJ, et al. Genome-wide microarray gene expression, array-CGH analysis, and telomerase activity in advanced ovarian endometriosis: a high degree of differentiation rather than malignant potential. *Int J Mol Med* 2008; 21(3):335-44.
15. Gogusey J, Bouquet de Jolinière J, Telvi L, Doussau M, du Manoir S, Stojkoski A, et al. Detection of DNA copy number changes in human endometriosis by comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 1999;105:444-51.
16. Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, Larin A, Savchenko V, et al. Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet* 2004;41:161-70.
17. Zhai Y, Iura A, Yeasmin S, Wiese AB, Wu R, Feng Y, et al. MSX2 is an oncogenic downstream target of activated WNT signaling in ovarian endometrioid adenocarcinoma. *Oncogene* 2011;epub ahead of print.
18. Gogusev J, Bouquet de Jolinière J, Telvi L, Doussau M, du Manoir S, Stojkoski A, et al. Genetic abnormalities detected by comparative genomic hybridization in a human endometriosis-derived cell line. *Mol Hum Reprod* 2000;6:821-7.
19. Viganò P, Somigliana E, Chiodo I, Abbiati A, Vercellini P. Molecular mechanisms and biological plausibility underlying the malignant transformation of endometriosis: a critical analysis. *Hum Reprod Update* 2006; 12:77-89.
20. Treolar SA, Wicks J, Nyholt DR, Montgomery GW, Bahlo M, Smith V, et al. Genomewide linkage study in 1176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet* 2005;77:365-76.

21. Peiffer SL, Herzog TJ, Tribune DJ, Mutch DG, Gersell DJ, Goodfellow PJ. Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer Res* 1995;55: 1922-6.
22. Zhao H, Wang Q, Bai C, He K, Pan Y. A cross-study gene set enrichment analysis identifies critical pathways in endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:94.
23. Li L, Yu C, Gao H, Li Y. Argonaute proteins: potential biomarkers for human colon cancer. *BMC Cancer* 2010;10:38-46.
24. Dedhar S. Integrins and signal transduction. *Curr Opin Hematol* 1999;6:37-43.
25. Dedhar S. Cell substrate interactions and signaling through ILK. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:250-6.
26. Wu C, Dedhar S. Integrin linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J Cell Biol* 2001;155:505-10.
27. Tu Y, Huang Y, Zhang Y, Hua Y, Wu C. A new focal adhesion protein that interacts with integrin-linked kinase and regulates cell adhesion and spreading. *J Cell Biol* 2001;153:585-98.
28. Persad S, Dedhar S. The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22:375-84.
29. Grund EM, Kagan D, Tran CA, Zeitvogel A, Starzinski-Powitz A, Nataraja S, Palmer SS. Tumor necrosis factor-alpha regulates inflammatory and mesenchymal responses via mitogen-activated protein kinase kinase, p38, and nuclear factor kappaB in human endometriotic epithelial cells. *Mol Pharmacol* 2008;73:1394-404.

30. Uz YH, Murk W, Bozkurt I, Kizilay G, Arici A, Kayisli UA. Increased c-Jun N-terminal kinase activation in human endometriotic endothelial cells. *Histochem Cell Biol*. 2011;135:83-91.
31. Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Hirata T, Harada M, et al. Possible pathophysiological roles of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2004;52:306-11.
32. Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol* 2010;7:164-74.
33. Mimeault M, Batra SK. New advances on critical implications of tumor- and metastasis-initiating cells in cancer progression, treatment resistance and disease recurrence. *Histol Histopathol* 2010;25:1057-73.
34. Pitsos M, Kanakas N. The role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of endometriosis. *Reprod Sci* 2009;16:717-26.
35. Amalinei C, Caruntu ID, Giusca SE, Balan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol* 2010;51:215-28.
36. Stefansson H, Geirsson RT, Steinhorsdottir V, Manolescu A, Kong A, Ingadottir G, et al. Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis. *Hum Reprod* 2002; 17:555-9.
37. Laudanski P, Szamatowicz J, Oniszczyk M. Profiling of peritoneal fluid of women with endometriosis by chemokine protein array. *Adv Med Sci* 2006;51:148-52.
38. Agic A, Djalali S, Wolfler MM, Halis G, Diedrich K, Hornung D. Combination of CCR1 mRNA, MCP1, and CA125 measurements in peripheral blood as a diagnostic test for endometriosis. *Reprod Sci* 2008;15:906-11.

39. Wu RJ, Van der Hoek KH, Ryan NK, Norman RJ, Robker RL. Macrophage contributions to ovarian function. *Hum Reprod Update* 2004;10:119–33.
40. Dmowski WP, Braun DP. Immunology of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gyn* 2004;18:245–63.
41. Chen QH, Zhou WD, Su ZY, Huang QS, Jiang JN, Chen QX. Change of proinflammatory cytokines follows certain patterns after induction of endometriosis in a mouse model. *Fertil Steril* 2010;93:1448-54.
42. de Ligt RA, Kourounakis AP, Ijzerman AP. Inverse agonism at G protein-coupled receptors: (patho)physiological relevance and implications for drug discovery. *Br J Pharmacol* 2000;130:1-12.
43. Borroni EM, Mantovani A, Locati M, Bonecchi R. Chemokine receptors intracellular trafficking. *Pharmacol Ther* 2010;127:1-8.
44. Vivacqua A, Bonofiglio D, Recchia AG, Musti AM, Picard D, Andò S, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol Endocrinol* 2006;20:631-46.
45. Rizner TL. Estrogen metabolism and action in endometriosis. *Mol Cell Endocrinol* 2009;307:8-18.
46. Young SL. Complexity in endometrial estradiol signalling. *Reprod Sci* 2008;14:627–8.

**Table 1.** Clinical information of patients and histopathological characterization of deeply infiltrating endometriotic lesions.

| Case | Age | Symptoms                                                                               | Histological characterization of deep lesions           | Other sites with EDT                        | Stage * |
|------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------|
| 1    | 23  | Dysmenorrhea                                                                           | Stromal; undifferentiated cells                         | Ovary                                       | IV      |
| 2    | 32  | Dysmenorrhea, infertility, intestinal alterations and dyspareunia                      | Stromal; well-differentiated and undifferentiated cells | Peritoneum                                  | II      |
| 3    | 32  | Dysmenorrhea, infertility, acyclic pelvic pain, intestinal alterations and dyspareunia | Stromal; well-differentiated cells                      | Peritoneum                                  | IV      |
| 4    | 35  | Intestinal alteration                                                                  | Stromal; well-differentiated and undifferentiated cells | Ovary                                       | III     |
| 5    | 38  | Dysmenorrhea, infertility, acyclic pelvic pain and intestinal alterations              | Stromal; well-differentiated and undifferentiated cells | Ovary, bladder and peritoneum               | IV      |
| 6    | 30  | Infertility, acyclic pelvic pain, intestinal alterations and dyspareunia               | Stromal; undifferentiated cells                         | Ovary, peritoneum and bladder               | III     |
| 7    | 33  | Dysmenorrhea, infertility, acyclic pelvic pain and intestinal alterations              | Stromal; well-differentiated and undifferentiated cells | Retrocervical region, peritoneum and ureter | I       |
| 8    | 36  | Dysmenorrhea, infertility, acyclic pelvic pain, intestinal alterations and dyspareunia | Stromal; well-differentiated and undifferentiated cells | Ovary and retro-cervical region             | IV      |
| 9    | 28  | Dysmenorrhea, infertility, acyclic pelvic pain, intestinal alterations and dyspareunia | Stromal; well-differentiated and undifferentiated cells | Ovary, peritoneum and retrocervical region  | III     |
| 10   | 39  | Dysmenorrhea, infertility, acyclic pelvic pain and intestinal alterations              | NI                                                      | Retrocervical region                        | I       |
| 11   | 29  | Dysmenorrhea, infertility, acyclic pelvic pain and intestinal alterations              | Stromal; well-differentiated and undifferentiated cells | Peritoneum, bladder and ureter              | III     |
| 12   | 38  | Dysmenorrhea, acyclic pelvic pain and intestinal alterations                           | Stromal; well-differentiated and undifferentiated cells | Peritoneum                                  | IV      |

|    |    |                                                                   |                                                         |                                       |     |
|----|----|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----|
| 13 | 35 | Dysmenorrhea, infertility and intestinal alterations              | Stromal; well-differentiated and undifferentiated cells | Bladder and peritoneum                | II  |
| 14 | 39 | Dysmenorrhea, infertility, intestinal alterations and dyspareunia | Stromal; well-differentiated and undifferentiated cells | Ovary, peritoneum and bladder         | III |
| 15 | 34 | Dysmenorrhea, acyclic pelvic pain and intestinal alterations      | Stromal; well-differentiated and undifferentiated cells | -                                     | I   |
| 16 | 32 | Infertility, intestinal alterations and dyspareunia               | Stromal; well-differentiated and undifferentiated cells | Ovary and retro-cervical region       | IV  |
| 17 | 29 | Infertility, intestinal alterations and dyspareunia               | Stromal; well-differentiated and undifferentiated cells | Ovary, peritoneum, bladder and ureter | IV  |
| 18 | 30 | Dysmenorrhea, acyclic pelvic pain and intestinal alterations      | Stromal; undifferentiated cells                         | Bladder and ureter                    | III |

---

NI: no information.

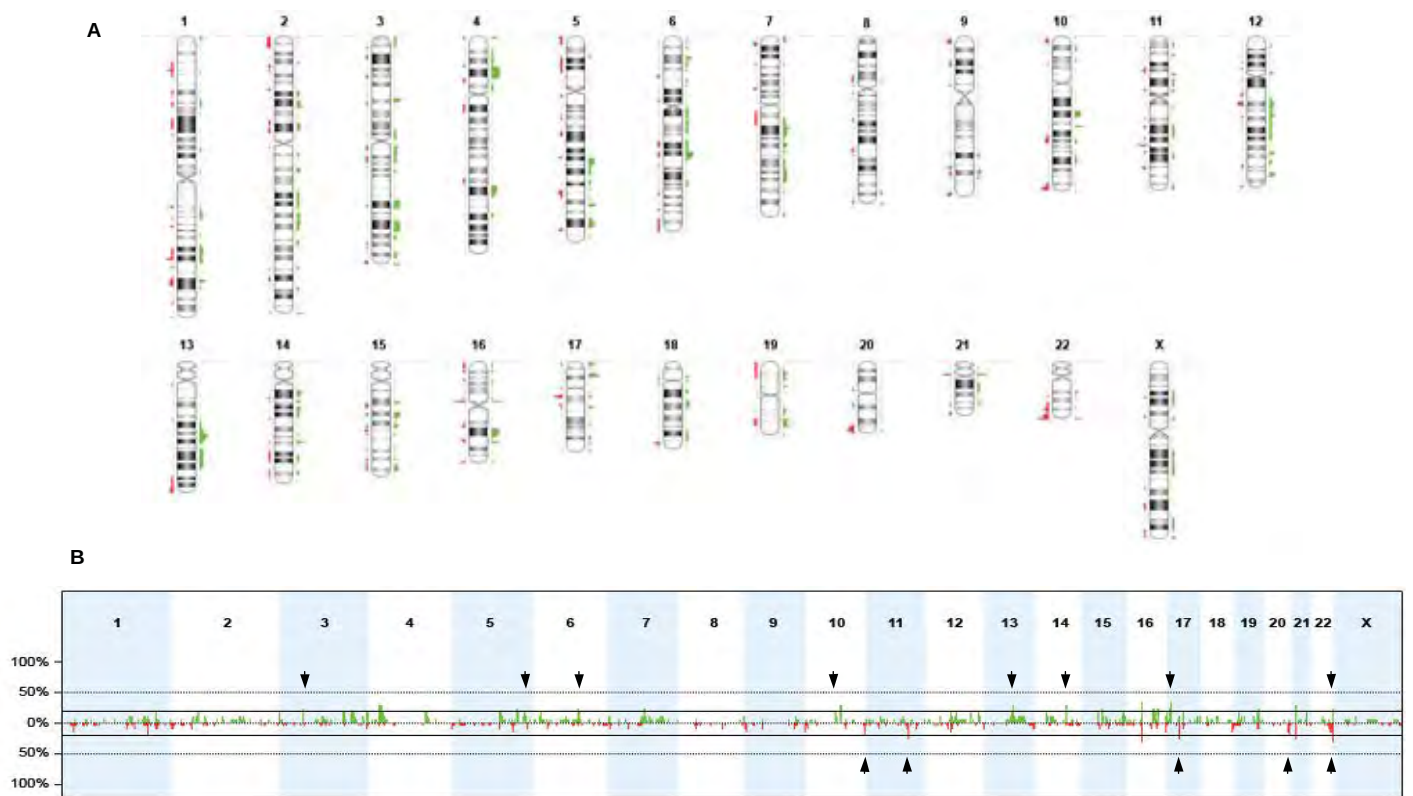


**Figure 1.** Frequency of genomic alterations observed in the 18 intestinal DIE lesions evaluated by aCGH. As it may note, the copy number variations were detected in all chromosomes (A), but recurrent alterations ( $P < 0.005$ , observed in  $\geq 20\%$  of cases) were identified at chromosomes 3, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 17, 20 and 22 (indicated by black arrows) (B). Gains and losses are shown in green and red, respectively. Adapted images generated by Nexus Copy Number version 5.0 software, Biodiscovery, Inc. All rights reserved.

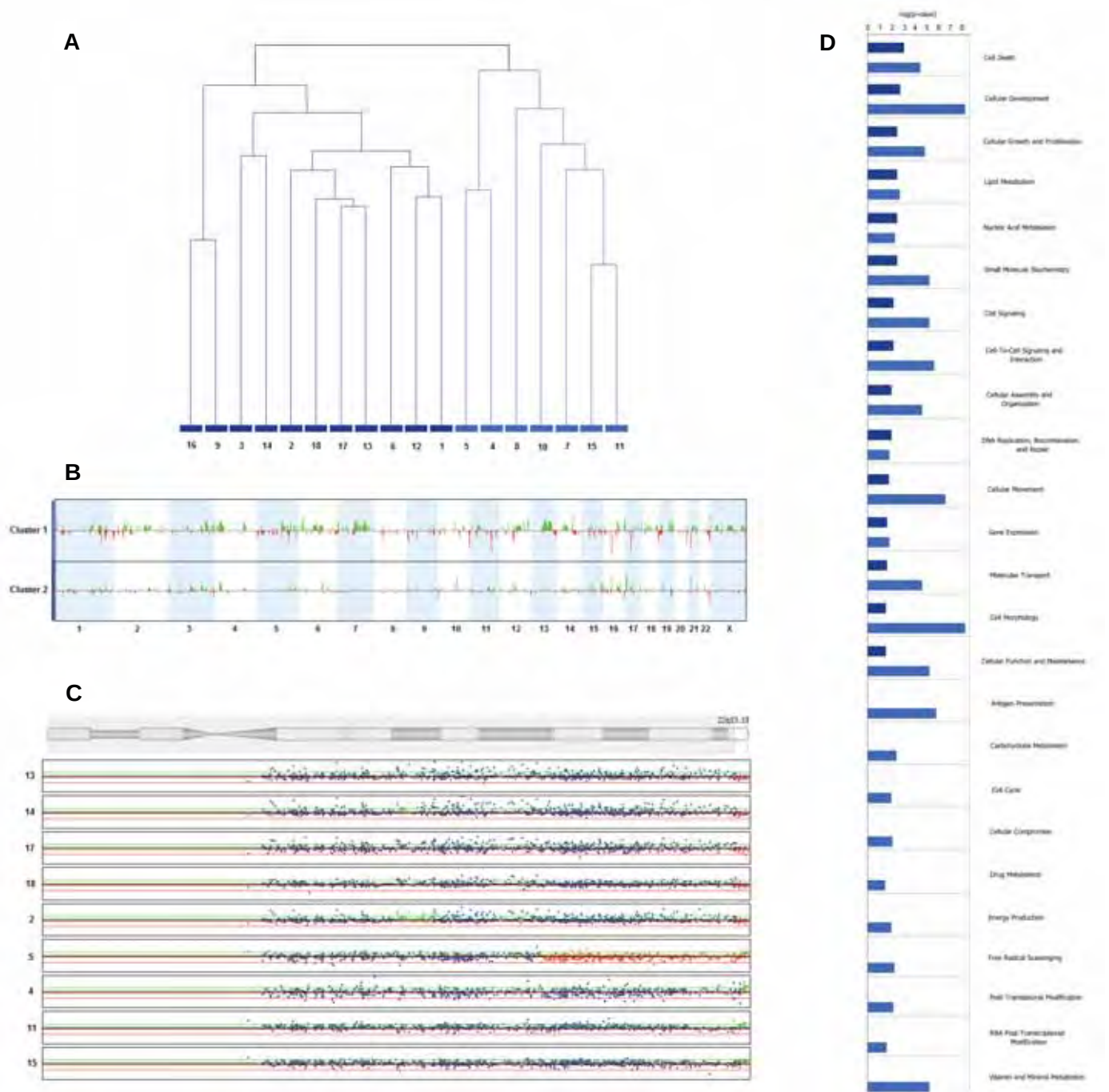


**Figure 2.** Unsupervised hierarchical clustering of intestinal DIE lesions based on genomic alterations profile. (A) Based-aCGH data defined two major groups: cluster 1 (light blue) and 2 (dark blue). (B) The genomic profile of each cluster showing higher frequency of CNV at cluster 1 (gains and losses are shown in green and red, respectively). (C) The hierarchical clustering was statistically associated with structural alteration on 22q13.33 ( $P=0.008$ ), which presented gain at cluster 1 and loss at cluster 2. (D) Functional analysis of altered genes at cluster 1 (light blue) and 2 (dark blue) revealed common and distinct biological processes affected between the groups.

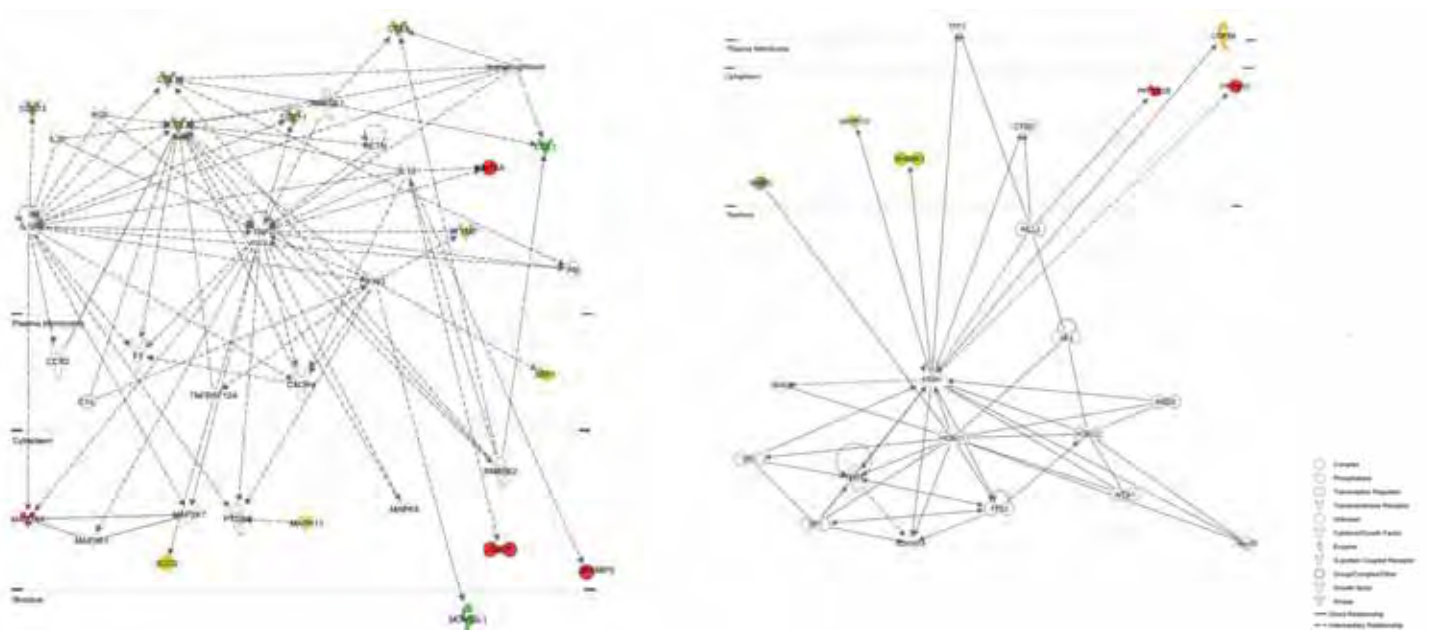


**Figure 3.** Most relevant molecular networks of interacting genes related to (A) immune response and (B) cell development and proliferation. The color of genes in the networks indicates gains (red), losses (green), gains and losses (yellow) or no alterations found (white).

**Supplement 1.** Genomic alterations detected by oligonucleotide aCGH in more than 20% of DIE samples (n=18). In bold, the genes mapped on 22q13.33 involved in gain at cluster 1 and loss at cluster 2.

| Chromosomal region | Start-Stop ends (bp) <sup>a</sup> | Size (Kb) | Event | N° Genes | miRNAs | Frequency of alteration (%) | CNVs (%) <sup>b</sup> | Cases             | Genes                                                                                                                                       |
|--------------------|-----------------------------------|-----------|-------|----------|--------|-----------------------------|-----------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Chr 3</b>       |                                   |           |       |          |        |                             |                       |                   |                                                                                                                                             |
| p14.3              | 54,639,489-55,666,753             | 1.027     | Gain  | 6        | 0      | 22,2                        | 22,1                  | 1, 6, 13, 17      | <i>CACNA2D3, HESRG, LRTM1, WNT5A, C3orf51, ERC2</i>                                                                                         |
| <b>Chr 5</b>       |                                   |           |       |          |        |                             |                       |                   |                                                                                                                                             |
| q32 - q33.1        | 146,368,51-148,007,493            | 1.639     | Gain  | 15       | 0      | 22,2                        | 15,8                  | 1, 4, 5, 16       | <i>PPP2R2B, STK32A, DPYSL3, JAKMIP2, SPINK1, SCGB3A2, C5orf46, SPINK5, SPINK14, SPINK6, SPINK13, SPINK7, SPINK9, FBXO38, HTR4</i>           |
| <b>Chr 6</b>       |                                   |           |       |          |        |                             |                       |                   |                                                                                                                                             |
| q16.3 - q21        | 101,110,187-105,335,828           | 4.226     | Gain  | 3        | 0      | 22,2                        | 35                    | 2, 5, 17, 18      | <i>ASCC3, GRIK2, HACE1</i>                                                                                                                  |
| <b>Chr 10</b>      |                                   |           |       |          |        |                             |                       |                   |                                                                                                                                             |
| q22.3              | 77,765,079-78,456,791             | 692       | Gain  | 2        | 0      | 27,7                        | 9,3                   | 2, 12, 13, 14, 18 | <i>C10orf11, KCNMA1</i>                                                                                                                     |
| q26.3              | 132,676,975-134,206,047           | 1.529     | Loss  | 10       | 0      | 22,2                        | 41,9                  | 5, 8, 10, 11      | <i>TCERG1L, PPP2R2D, BNIP3, JAKMIP3, DPYSL4, STK32C, LRRC27, PWWP2B, C10orf91, INPP5A</i>                                                   |
| <b>Chr 11</b>      |                                   |           |       |          |        |                             |                       |                   |                                                                                                                                             |
| q21                | 93,879,810-94,578,828             | 699       | Loss  | 9        | 0      | 22,2                        | 8,9                   | 7, 8, 10, 11, 15  | <i>FUT4, PIWIL4, AMOTL1, CWC15, KDM4D, KDM4DL, SFRS2B, ENDOD1, SESN3</i>                                                                    |
| <b>Chr 13</b>      |                                   |           |       |          |        |                             |                       |                   |                                                                                                                                             |
| q21.31 - q21.32    | 63,322,957-65,823,692             | 2.501     | Gain  | 1        | 0      | 22,2                        | 75,4                  | 4, 5, 10, 16, 18  | <i>PCDH9</i>                                                                                                                                |
| <b>Chr 14</b>      |                                   |           |       |          |        |                             |                       |                   |                                                                                                                                             |
| q24.1 - q24.2      | 69,267,601-69,391,382             | 124       | Gain  | 3        | 0      | 27,7                        | 0                     | 4, 5, 11, 15, 16  | <i>LOC100289511, SFRS5, SLC10A1</i>                                                                                                         |
| <b>Chr 17</b>      |                                   |           |       |          |        |                             |                       |                   |                                                                                                                                             |
| p12- p13.1         | 9,618,350-12,444,195              | 2.826     | Gain  | 19       | 1      | 27,7                        | 16,5                  | 2, 12, 13, 14, 17 | <i>DHRS7C, GLP2R, RCVRN, GAS7, MYH13, MYH8, MYH4, MYH1, MYH2, MYH3, SCO1, C17orf48, TMEM220, PIRT, SHISA6, DNAH9, ZNF18, MIR744, MAP2K4</i> |
| q12                | 28,986,700-30,059,953             | 1.073     | Loss  | 9        | 0      | 22,2                        | 6,4                   | 7, 8, 10, 11, 15  | <i>ACCN1, CCL2, CCL7, CCL11, CCL8, CCL13, CCL1, C17orf102, TMEM132E</i>                                                                     |

Supplement 1.Continuation.

| Chromosomal<br>region | Start-Stop ends       | Size<br>(Kb) | Event | N°<br>Genes | miRNAs | Frequency of<br>alteration (%) | CNVs<br>(%)* | Cases                | Genes                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------|-----------------------|--------------|-------|-------------|--------|--------------------------------|--------------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Chr 20</b>         |                       |              |       |             |        |                                |              |                      |                                                                                                                                                                                                                                                                |
| q13.33                | 59,332,942-59,956,016 | 623          | Loss  | 1           | 0      | 22,2                           | 33,4         | 8, 10, 11, 14        | CDH4                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Chr 22</b>         |                       |              |       |             |        |                                |              |                      |                                                                                                                                                                                                                                                                |
| q13.33                | 48,821,440-49,691,432 | 870          | Loss  | 33          | 0      | 33,3                           | 58,3         | 2, 5, 13, 14, 17, 18 | TTLL8, MLC1, MOV10L1, PANX2, TRABD, SELO, TUBGCP6, HDAC10, MAPK12, MAPK11, PLXNB2, FAM116B, SAPS2, SBF1, ADM2, MIOX, LMF2, NCAPH2, SCO2, TYMP, ODF3B, KLHDC7B, C22orf41, CPT1B, CHKB-CPT1B, CHKB, LOC100144603, MAPK8IP2, ARSA, SHANK3, ACR, RABL2B, RPL23AP82 |
| q13.33                | 49,041,686-49,691,432 | 650          | Gain  | 25          | 0      | 22,2                           | 49,2         | 4, 5, 11, 15         | MAPK12, MAPK11, PLXNB2, FAM116B, SAPS2, SBF1, ADM2, MIOX, LMF2, NCAPH2, SCO2, TYMP, ODF3B, KLHDC7B, C22orf41, CPT1B, CHKB-CPT1B, CHKB, LOC100144603, MAPK8IP2, ARSA, SHANK3, ACR, RABL2B, RPL23AP82                                                            |

<sup>a</sup> Regions are compatible with the UCSC human hg18 assembly.

<sup>b</sup>Based on Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>)