

CAMILA GONTIJO DE MORAIS  
LUIZ CLÁUDIO FREITAS PEREIRA DE MELO  
MARCOS PAULO SOARES DA SILVA  
PEDRO LUIZ SILVA DE MIRANDA  
RAFAEL CAMPOS DE ÁVILA PEREIRA  
VINÍCIUS COTTA DOS SANTOS

**Determinação e comparação da expressão gênica  
entre endométrios normais, hiperplásicos e com  
endometriose.**

Trabalho apresentado à disciplina Biologia Molecular, do curso de Ciências  
Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais. Período: 3º Turno:  
diurno.

Belo Horizonte  
Minas Gerais – Brasil  
2007

## SUMÁRIO

<b>I – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>II – OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
<b>III – JUSTIFICATIVAS.....</b>	<b>5</b>
<b>IV – METODOLOGIA.....</b>	<b>6</b>
IV.1 – MICROARRANJO.....	6
IV.2 – SEQUENCIAMENTO.....	10
<b>V – CRONOGRAMA.....</b>	<b>12</b>
<b>VI – ORÇAMENTO.....</b>	<b>12</b>
<b>VII – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..</b>	<b>13</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>15</b>

## I - Introdução:

A implantação do embrião é um evento crítico para a gravidez humana e sua ausência pode estar relacionada à infertilidade. O balanceamento correto de vários fatores de crescimento, citocinas, mediadores lipídicos, fatores de transcrição e outras moléculas reguladas por hormônios esteróides interferem de maneira vital na preparação do útero para a nidação (Develioglu *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2000; Carson *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2002; Guidice, 2003). Entretanto, é mais admissível enxergar o processo de implantação como regulado pela pouca ou super-expressão de diversos genes sobre o controle dos fatores citados. Apesar da incerteza a cerca do momento exato de implantação do embrião, estudos clínicos sugerem que a denominada “janela de implantação” está geralmente confinada aos dias 20-24 do ciclo ovulatório normal (Psychoyos, 1994). As dinâmicas da transição de um endométrio não-receptivo para a forma receptiva são pouco entendidas, porém em humanos uma crescente taxa de abortos espontâneos tem sido observada durante a transferência do embrião no período da “janela de implantação” (Navot *et al.*, 1991). A taxa abortiva é crescente em mulheres brasileiras e aos poucos ocupa uma das principais causas de infertilidade.

A infertilidade é um distúrbio ou condição temporária do aparelho reprodutor feminino ou masculino que dificulta ou impede o casal de ter filhos. Para um casal ser considerado infértil e precisar de ajuda para a concepção, geralmente é necessário pelo menos um ano de tentativas para a mulher engravidar. Durante esse tempo métodos anticoncepcionais não podem ser usados e as relações sexuais têm que ser freqüentes.

Nesse projeto daremos ênfase à infertilidade feminina, causada principalmente por (fig.1):

- 1- Distúrbios hormonais ou ovulatórios: a maioria causada pela deficiência ou produção exacerbada, como na hiperplasia, dos hormônios controladores (FSH, LH, estrogênio e progesterona). Também pode ocorrer

infertilidade se os ovários forem resistentes aos níveis normais de hormônio ou se eles estiverem ausentes, danificados ou doentes.

2- Distúrbios anatômicos: vulvite, vaginite, geralmente causada por fungos ou parasitas; DSTs como sífilis e gonorréia; câncer no colo do útero (cervical), do endométrio ou dos ovários; infecções uterinas (endometrite); tubas uterinas bloqueadas ou danificadas; síndrome dos ovários policísticos; endometriose.

3- Distúrbios cromossômicos: quando há um número anormal de cromossomos sexuais, na síndrome de Turner por exemplo.

4- Outras causas ou infertilidade inexplicada: muco cervical abundante ou com presença de anticorpos contra os espermatozóides. Fatores como idade e estilo de vida podem interferir na fertilidade.

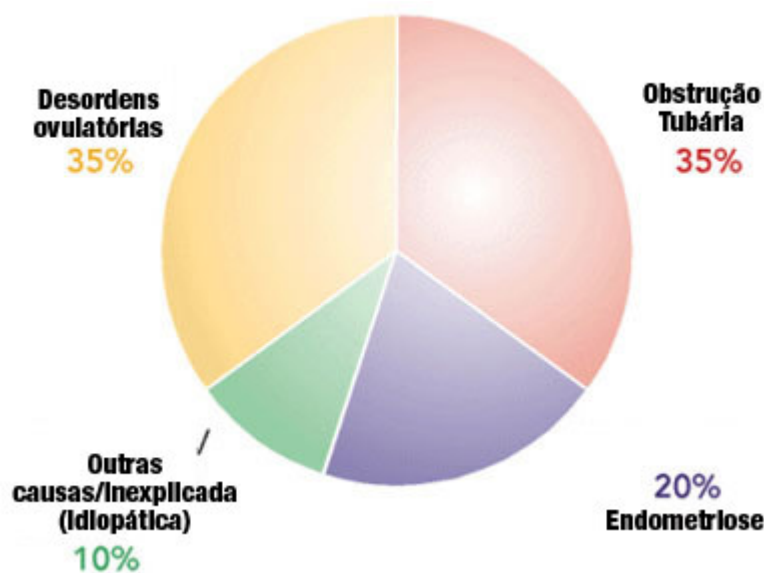


Figura 1: porcentagens das principais causas de infertilidade.

Para diagnosticar a infertilidade feminina são investigados distúrbios ovulatórios, características do muco cervical no período fértil, uma dosagem hormonal para verificar a atividade endócrina dos ovários é feita e é fundamental que seja estudado o fator canalicular (tubo-peritoneal, corporal e cervico-vaginal), já que desempenha a função de nutrição, captação e transporte dos

espermatozóides e do ovócito. Para isso deve ser feita uma Histeroscopia com o objetivo de visualizar a cavidade interna do útero e afastar a presença de sinéquias pós-curetagem uterina ou ainda pólipos endometriais e miomas submucosos, assim como uma possível endometrite, os quais dificultariam a implantação embrionária. Também pode ser feita uma Laparoscopia, que investiga a cavidade pélvica afastando a presença de aderências pélvicas, endometriose, obstrução tubária, má formação uterina, mioma e doença inflamatória pélvica, e uma ecografia transvaginal que é realizada no período ovulatório e avalia a presença e o grau de maturidade dos folículos ovarianos além da espessura da mucosa endometrial.

Algumas das causas da infertilidade são tratadas e revertidas por tratamento hormonal, pequenas cirurgias e inseminação artificial. Para os casos mais complexos e difíceis recomenda-se a reprodução assistida.

A endometriose é uma doença caracterizada pela presença de implantes ectópicos de glândulas e/ou estroma endometrial em regiões fora do útero, comumente em ovários, tubas uterinas, peritônio, cavidade pleural, fígado, intestinos, bexiga e rins. Também já foram relatados casos de endometriose em homens. Esses implantes, assim como o tecido endometrial de crescimento uterino, apresentam sua atividade regulada pelos hormônios do ciclo menstrual. É considerada uma entidade enigmática, uma vez que possui etiopatogenia incerta e diagnóstico indefinido. A endometriose atinge 5% da população feminina brasileira e corresponde a 20% das mulheres inférteis.

Os sintomas apresentados pelas portadoras assumem intensidades variáveis não correspondentes à gravidade da enfermidade. Mulheres com estado severo de endometriose podem ser assintomáticas, enquanto pacientes com sintomas graves podem apresentar a doença em um estado mais brando. Os principais sintomas dessa doença são a dor pélvica e sangramento periódico das regiões afetadas.

Acredita-se, atualmente, que a endometriose não seja uma desordem isolada e sim um quadro gerado pela atividade de várias doenças, é

provavelmente por esse motivo que pouco se sabe sobre sua fisiopatologia e evolução natural.

A relação existente entre a endometriose e a infertilidade é incerta, apesar de existirem referências antigas sobre ela na literatura. Acredita-se que as distorções da anatomia pélvica presentes em mulheres com endometriose grave sejam um dos motivos para a falta de fecundidade nessas pacientes, porém esse sintoma não explica a infertilidade de mulheres com um estado moderado dessa desordem. O que é postulado atualmente conclui que fatores como problemas endócrinos, alterações imunológicas e defeitos uterinos intrínsecos são também responsáveis pela infertilidade.

A hiperplasia endometrial trata-se de uma proliferação anormal de glândulas e estroma, com predominância do componente glandular, o que provoca o aumento do volume e dos graus variados de desarranjo arquitetural do revestimento do endométrio. Sua importância clínica é o fato de que pode causar hemorragia uterina anômala, quadros de infertilidade, estar associada a tumores ovarianos produtores de estrogênios, resultar de estrogenoterapia isolada e preceder o câncer de endométrio ou mesmo ocorrer simultaneamente com ele. Os casos de hiperplasia endometrial foram classificados e divididos em duas categorias: simples e complexa (referidas ao grau de desarranjo arquitetural), podendo ambas serem com ou sem atipia (alterações citológicas que diferem completamente do epitélio endometrial normal, sendo importante na predição de risco para um carcinoma de endométrio).

A hiperplasia é causada pela resposta do endométrio à estimulação estrogênica prolongada (seja exógena ou endógena), sem o efeito contrabalanceador da progesterona. Normalmente ocorre nos extremos etários da vida reprodutiva da mulher, devido aos ciclos anovulatórios. Outras possíveis causas de hiperplasia endometrial podem ser o uso de estrógenos por longos períodos sem a administração concomitante de progestágenos ou mesmo neoplasias ovarianas produtoras de estrogênio. Mulheres obesas são mais predispostas ao aparecimento de hiperplasias, pois o tecido adiposo, além de

armazenar estrógenos, pode converter andrógenos circulantes em mais estrógenos.

O potencial de malignidade pode ser influenciado pela idade, obesidade, doença ovariana concomitante, endocrinopatia e intensidade da atipia citológica.

Portanto, baseado no estudo feito, evidencia-se que pouco é conhecido sobre a relação entre as causas de infertilidade, dentre elas a hiperplasia endometrial e a endometriose, e fatores genéticos reguladores do ciclo natural, os quais podem ser responsáveis por essas patologias.

## **II - Objetivos:**

Objetivos Gerais:

O projeto tem como objetivo geral comparar a expressão gênica de células do endométrio entre mulheres férteis, mulheres com infertilidade portadoras de endometriose e portadoras de hiperplasia endometrial.

Objetivos Específicos:

1- Analisar o perfil de expressão gênica nas células do endométrio de mulheres férteis, mulheres portadoras de endometriose, e mulheres portadoras de hiperplasia endometrial.

2- Fazer a identificação dos genes com padrões diferentes de expressão em mulheres férteis, mulheres portadoras de endometriose, e mulheres portadoras de hiperplasia endometrial.

3- Validar os genes candidatos através do sequenciamento e comparação das seqüências gênicas entre os três grupos de mulheres estudados.

## **III – Justificativas:**

A infertilidade feminina é um distúrbio ou condição temporária que impede ou dificulta a gravidez. A endometriose é responsável por 20% dos casos de

infertilidade registrados no Brasil. Essa patologia caracteriza-se pela invasão de tecido endometrial em regiões fora do útero. Na hiperplasia endometrial ocorre a hiper-estimulação do crescimento do endométrio pelos hormônios do ciclo menstrual, o que resulta em um aumento exagerado desse tecido. Essa desordem afeta uma relevante parte das mulheres inférteis.

Esperamos com esse projeto buscar soluções para essas mulheres que compõem uma porcentagem razoável da população. Acreditamos que a análise da expressão gênica do tecido endometrial nos revelará quais genes estão envolvidos nessas desordens e, a partir dessa informação, poderemos desenvolver melhores técnicas de diagnóstico e acompanhamento dessas patologias. Futuramente, acreditamos que a nossas pesquisas e a de vários outros autores sejam capazes de abrir novas possibilidades de tratamento e curas para essas doenças.

#### **IV – Metodologia:**

Para atingirmos nosso objetivo, usaremos a técnica de microarranjo de cDNA de amostras de tecido uterino extraídas de mulheres portadoras de endometriose, hiperplasia endometrial, e mulheres férteis. A extração destes tecidos deverá ser realizada após a assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”. Em seguida faremos o sequenciamento dos genes candidatos e a comparação das seqüências gênicas entre os três grupos de mulheres por meio de cromatogramas.

##### **IV.1 – Microarranjo:**

Para a realização do experimento serão analisados os endométrios de 15 mulheres voluntárias recrutadas no período de um ano, com idades entre 35 e 42 anos, ciclos menstruais regulares e prévia ovulação confirmada. Cada uma assinará um termo de consentimento e compromisso com o projeto aprovado pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Serão criados três grupos com 5



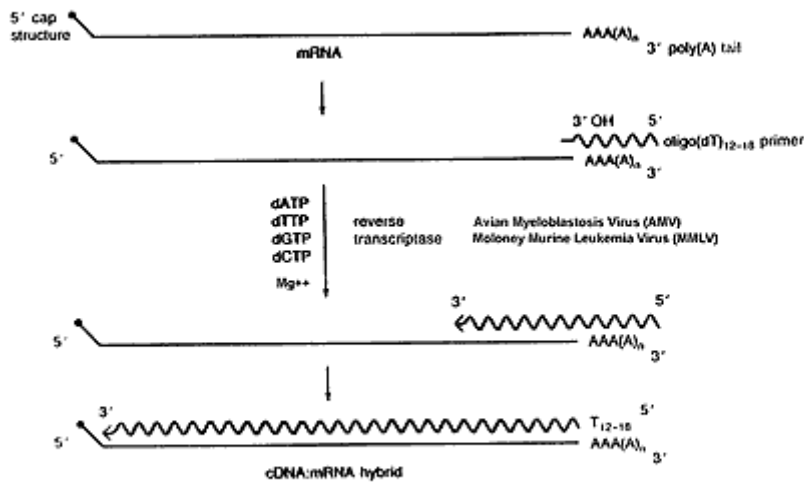
indivíduos em cada um do seguinte modo: Grupo I: controle, Grupo II: Endometriose, Grupo III: Hiperplasia Endometrial. A confirmação do estado uterino, patológico ou não, de cada voluntária será feita mediante uma ultrasonografia transvaginal (Mirkin *et al.*, 2005).

Primeiramente será feita uma biópsia do endométrio de cada mulher em um determinado dia da chamada “janela de implantação” do ciclo natural. O tecido será retirado de acordo com um protocolo da Unimar (Bridgeport, CT, EUA) no dia 21 do ciclo menstrual, data 7 dias posterior à ovulação (dia14) e 8 dias após um exame urinário que as voluntárias farão com base no kit QuikVue One Step hCG Urine (Quidel, San Diego, CA, EUA) para verificação do nível do hormônio Gonadotrofina Coriônica Humana. Cada amostra será dividida em duas porções: uma fixada em formalina a 10% e processada para análise histológica (hematoxilina-eosina), e outra imediatamente congelada em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA (Mirkin *et al.*, 2005).

Em segundo lugar, para o microarranjo, cada amostra de tecido será processada individualmente. O RNA total será isolado de acordo com o protocolo BioModule da Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). A purificação será com base no RNeasy Total RNA Clean-up (Quiagen, Valencia, CA, EUA) e a integridade do ácido nucléico medida pelo 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, EUA).

Na produção da primeira fita de cDNA um primer T-7 deverá anelar-se ao mRNA de acordo com MAXiscript T-7 kit (Life Techonologies, Carlsbad, CA, EUA). Uma enzima transcriptase reversa será adicionada junta das condições necessárias e o primer T-7 será incorporado á primeira fita de cDNA (Mirkin *et al.*, 2005) (fig. 2).

**Traditional cDNA synthesis**

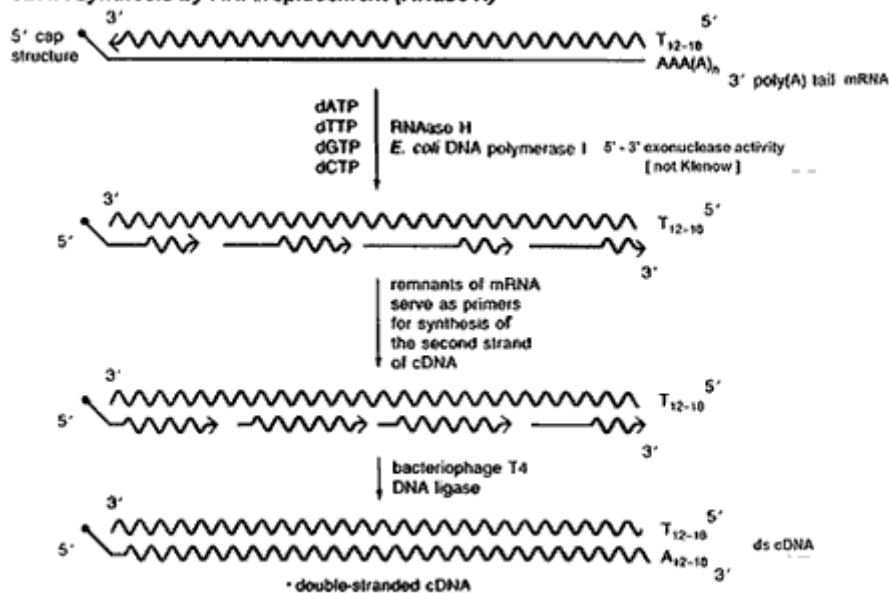


Synthesis of the first strand of cDNA using an oligo(dT) primer and reverse transcriptase.

Figura 2: produção da primeira fita de cDNA.

Na síntese da segunda fita serão adicionados RNase H para a fragmentação da fita de RNA, DNA polimerase para a produção, a partir dos fragmentos de RNA, da fita complementar de cDNA, e DNA ligase para a junção dos pedaços de DNA recém produzidos (fig 3).

**cDNA synthesis by RNA replacement (RNase H)**



Replacement synthesis of double-stranded cDNA.

Figura 3: produção da segunda fita de cDNA.

Durante sua produção o cDNA da amostra experimental deverá ser marcado com fluorocromo vermelho (ficoeritrina) e o da amostra controle com fluorocromo verde (fluoresceína), de acordo com o protocolo BioModule Microlabel (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Após a síntese do cDNA completo, este será purificado com fenolclorofórmio, precipitado e redissolvido em água sem nucleases.

Para a hibridização será usado o chip HG\_U95Av2 da Affymetrix contendo oligonucleotídeos representantes de 12686 genes e os reagentes necessários (Mirkin *et al.*, 2005). A leitura do microarranjo será feita pelo Significance Analysis of Microarrays (SAM) software, método considerado superior em relação a estudos estatísticos convencionais (Tusher *et al.*, 2002) (fig 4).

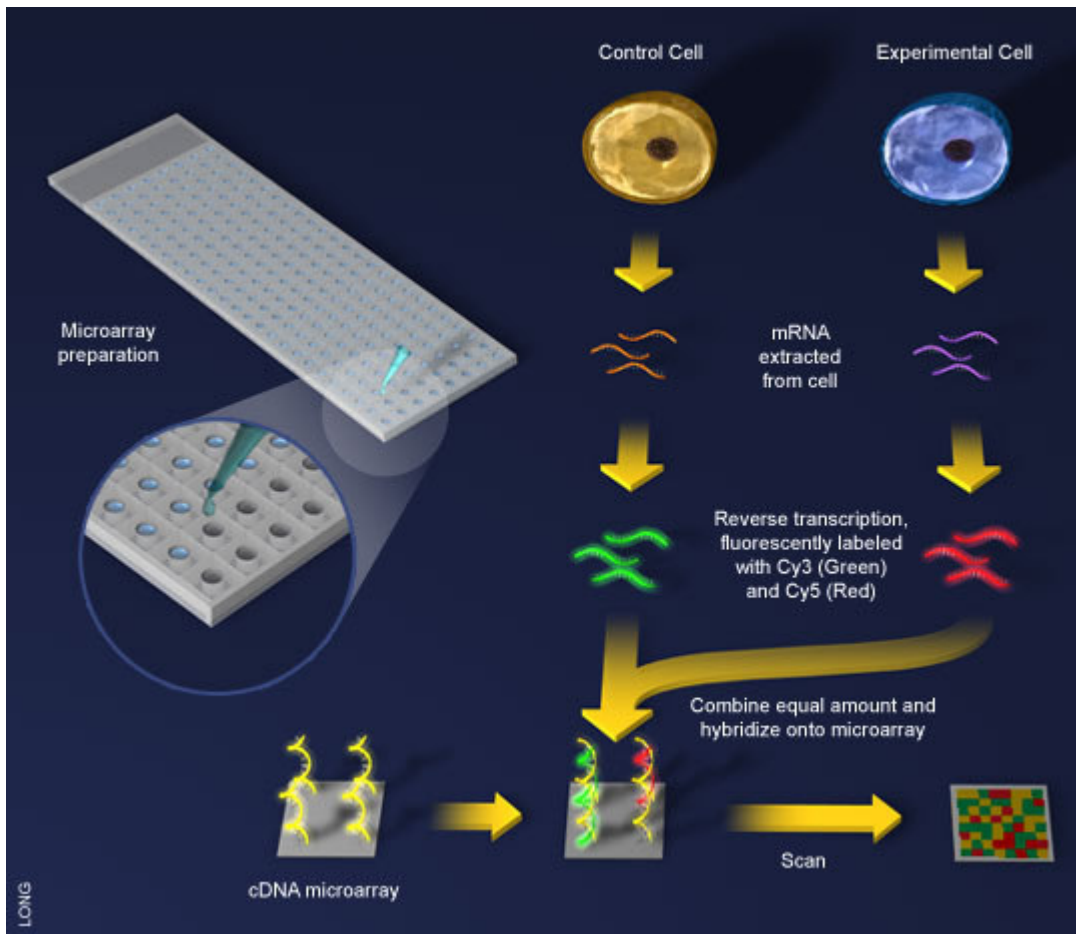


Figura 4: hibridização e leitura do microarranjo.

Serão comparados os microarranjos feitos com mRNAs de endométrios normais e com endometriose com os feitos com endométrios normais e com hiperplasia endometrial para a análise do perfil de expressão dos genes em cada situação.

#### IV. 2 – Sequenciamento

Após a análise do perfil da expressão gênica nas células endometriais das mulheres dos três grupos em estudo, por meio da técnica de microarranjo, serão seqüenciados genes com diferentes graus de expressão entre mulheres portadoras de endometriose, hiperplasia endometrial, e mulheres férteis (não portadoras). Primeiro deverá ser feita uma reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificação dos fragmentos de interesse. Para o sequenciamento deve-se certificar de que não houve amplificação inespecífica no produto de PCR, ou seja, que apareceram bandas fortes no teste, pois bandas claras podem indicar que não houve amplificação de qualidade ou geração de poucos fragmentos. Os fragmentos amplificados deverão ser purificados utilizando-se polietilenoglicol (PEG) para que haja apenas fragmentos de interesse. Para o sequenciamento, utilizaremos o sistema ABI 3130. A reação de sequenciamento será feita com o Kit Big Dye Terminator, cujos volumes e concentrações seguem abaixo:

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Sugerido</b>
<b>BigDye Mix*</b>	<b>8<math>\mu</math>L</b>	<b>0,3<math>\mu</math>l</b>
<b>Tampão Save Money</b>	<b>0<math>\mu</math>l</b>	<b>1,77<math>\mu</math>l</b>
<b>pGEM (200ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>2<math>\mu</math>L</b>	<b>1<math>\mu</math>l (200ng/<math>\mu</math>l)</b>
<b>Primer (0.8pmol/<math>\mu</math>L)</b>	<b>4<math>\mu</math>L (3.2pmol)</b>	<b>4<math>\mu</math>L (3.2pmol)</b>
<b>Água</b>	<b>6<math>\mu</math>L</b>	<b>3,2<math>\mu</math>l</b>
<b>Volume Total</b>	<b>20<math>\mu</math>L</b>	<b>10<math>\mu</math>l</b>

O tampão Save Money pode ser pedido junto com o Kit de sequenciamento. Ele consiste em uma mistura de fatores e sais essenciais à reação, que já estão inclusos no Big Dye Mix, portanto quando reduzimos a quantidade de Mix devemos repor esses fatores acrescentando o tampão. Para a preparação do mix serão utilizados 0,3 $\mu$ l de Big Dye Mix, 1,77 $\mu$ l de tampão Save Money e um volume de primer Forward ou Reverse para a concentração de 3,2pmol por reação. Primeiramente será transferido para cada tubo ou placa o volume de mix de reação. Depois será acrescentado o volume de produto de PCR para a concentração ideal por reação e 10 $\mu$ l de água MQ será adicionado para estabelecer o volume final. Finalmente será iniciada a reação de termociclagem. Após a última, deverá ser feita a precipitação com isopropanol. Essa precipitação destina-se a retirar excesso de primer, sais, nucleotídeos não incorporados e enzimas utilizados na reação de sequenciamento. A resuspensão e desnaturação destinam-se à preparação da amostra para o carregamento do seqüenciador e, portanto, deverão ser feitas imediatamente antes do calibramento do seqüenciador da seguinte maneira:

1. Resuspender em 15-25 $\mu$ L de formamida Hi-Di. Não é recomendado resuspender em volumes menores que 10  $\mu$ l devido à possibilidade de não entrada do capilar na amostra.
2. Desnaturar em placa aquecida ou em Banho Maria à temperatura de 94°C por 5 minutos.
3. Colocar a placa ou tubo em gelo por 2 minutos para o choque térmico que impede a renaturação das fitas.
4. Carregar o equipamento e correr o sequenciamento.

O resultado do sequenciamento deverá ser analisado com auxílio de programas de bioinformática como Phred e Phrap. O Phred é uma ferramenta especializada na leitura de cromatogramas atribuindo uma base para cada pico identificado, além de indicar um valor quantitativo para cada base como estimativa da taxa de erro. O Phrap é utilizado para montagem de seqüências, geração de arquivos de saída que contém dados importantes, além de possibilitar a visualização da montagem por outros programas. Por fim serão comparadas as seqüências obtidas de cada gene e investigadas as prováveis alterações.

## V – Cronograma:

	1° ano	1° mês	2° mês	3° mês	4° mês	5° mês	6° mês	7° mês	8 mês	9° mês	10° mês	11° mês	12° mês
		2° ano	2° ano	2° ano	2° ano	2° ano	2° ano	2° ano	2° ano	2° ano	2° ano	2° ano	2° ano
Recrutamento de voluntárias	X												
Biópsia endometrial		X											
Microarranjo			X	X									
Sequenciamento					X	X	X	X	X	X	X	X	
Redação final													X

## VI - Orçamento:

1. BioModule – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA – R\$2196,48
2. BioModule Microlabel – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA – R\$2728,00
3. QuikVue One Step hCG Urine – Quidel, San Diego, CA, EUA – R\$15,55
4. RNeasy Total RNA Clean-up – Quiagen, Valencia, CA, EUA – R\$515,59
5. 2100 Bioanalyzer – Agilent, Santa Clara, CA, EUA – R\$52,80
6. MAXIscript T7 Kit – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA – R\$440,00
7. Chip HG\_U95Av2 – Affymetrix – R\$1408,00
8. Kit Big Dye Terminator – Amersham Pharmacia Biotech - R\$5060,00
9. Biopsy Cassete Blue 4x250/cs – Unimar, Bridgeport, CT, EUA – R\$1527,68

Orçamento total previsto: R\$13944,10

## VII - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Destinado a indivíduos compromissados com a realização do projeto: Determinação e comparação do perfil de expressão gênica entre endométrios normais, hiperplásicos e com endometriose.

I - Dados de identificação do sujeito da pesquisa e do responsável legal

Nome \_\_\_\_\_ do  
paciente \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Identidade \_\_\_\_\_ Data nascimento \_\_\_\_\_

Sexo \_\_\_\_\_

Endereço \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Bairro \_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_

Estado \_\_\_\_\_

Telefone \_\_\_\_\_

CEP \_\_\_\_\_

Responsável

legal \_\_\_\_\_

Grau \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ parentesco \_\_\_\_\_

Identidade \_\_\_\_\_

## AUTORIZAÇÃO

Eu, \_\_\_\_\_, portador do RG \_\_\_\_\_, com \_\_\_\_ anos de idade, declaro para os devidos fins, que concordo em participar da investigação científica sobre a determinação e comparação do perfil de expressão gênica entre endométrios normais, hiperplásicos e com endometriose, a ser realizada no Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Para ajudar no estudo desta doença, devo submeter-me a exames clínicos e à análise molecular, ou seja, avaliação do meu RNA, além de responder a um questionário clínico. Para que seja realizada a análise molecular, permitirei a biópsia de pequena parte de meu tecido endometrial. Declaro estar de acordo que os resultados de meus exames poderão ser utilizados em pesquisa, bem como publicados em meio científico desde que minha identidade seja preservada. Declaro ainda que recebi todos os esclarecimentos sobre a importância da referida pesquisa e que a minha participação não implicará em qualquer risco à minha saúde. Caso desistir desta autorização, todos os resultados me serão fornecidos bem como a continuação de terapêuticas que venham a beneficiar-me, sem qualquer prejuízo.

De minha livre e espontânea vontade, assino esta declaração/autorização.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de  
\_\_\_\_\_, de 2005.

\_\_\_\_\_  
Probando ou responsável



## Bibliografia:

1. <http://www.medigenomix.de/en/molbio3techinfoE.htm> acessado em 5 de dezembro de 2007.
2. [http://plasticdog.cheme.columbia.edu/undergraduate\\_research/projects/sahil\\_mehta\\_project/work.htm](http://plasticdog.cheme.columbia.edu/undergraduate_research/projects/sahil_mehta_project/work.htm) acessado em 5 de dezembro de 2007.
3. [http://www.fertilidadeonline.com.br/latam\\_brazil/concern/Infertility\\_in\\_Females/index.jsp](http://www.fertilidadeonline.com.br/latam_brazil/concern/Infertility_in_Females/index.jsp) acessado em 5 de dezembro de 2007.
4. <http://www.gineco.com.br/infertil4.htm> acessado em 5 de dezembro de 2007.
5. <http://www.saudevidaonline.com.br/artigo84.htm> acessado em 6 de dezembro de 2007.
6. <http://www.portaldeginecologia.com.br/modules.php?name=News&file=article&sid=100> acessado em 7 de dezembro de 2007.
7. <http://www.infertilidadefeminina.com.br/> acessado em 7 de dezembro de 2007.
8. EMBRAPA. Plataforma de Sequenciamento de DNA. "Sequenciamento de DNA utilizando o Seqüenciador ABI Prism 3700". Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/laboratorios/psd/composicao.html>; acessado em 9 de dezembro de 2007.
9. FIOCRUZ. Pós Graduação em Ciências da Saúde. *Técnicas Básicas de Biologia Molecular*. Disponível em: < <http://www.cpqrr.fiocruz.br/ensino/> > acessado em 9 de dezembro de 2007.
10. NASCIMENTO, A.A.C.; ESPERIAFICO, E.M.; LARSON, M.L.P.; MONESI, N.; ROSSI, N.M.M.; RODRIGUES, V. "Tecnologia do DNA Recombinante". Universidade de São Paulo: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1999.
11. LABORATÓRIO GENESIS. *Sequenciamento de DNA*. Disponível em: < <http://educacao.genesisdbm.com.br/sequenciamento.shtml> > acessado em 9 de dezembro de 2007.

12. Marques, Marcos Roberto. Endometriose e infertilidade: revisão sistemática da literatura e estudo de casos. Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina, para a conclusão do curso de medicina.
13. Abrão, Maurício Simões; Carlos Alberto Petta; Alexandre Pupo Nogueira; Joji Ueno; José Alexandre Portinho; Rosa Maria Neme e Sérgio podgaec. Microlaparoscopia em Endometriose.
14. Gordon MD, Ireland K. Pathology of hyperplasia and carcinoma of the endometrium. *Semin Oncol* 1994;21:64-70.
15. Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ. The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients. *Cancer* 1985;56(2):403-12.
16. Key TJA, Pike MC. The dose-effect relationship between "unopposed" oestrogens and endometrial mitotic rate: its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk. **Br J Cancer** 1988;57:205-12.
17. Henderson BE, Casagrande JT, Pike MC. The epidemiology of endometrial cancer in young women. **Br J Cancer** 1983;47:749-56.
18. Develioglu OH, Hsiu JG, Nikas G, Toner JP, Oehninguer S and Jones HW Jr (1999) Endometrial estrogen and progesterone receptor and pinopode expression in stimulated cycles of oocyte donors. *Fertile Steril* 71,1040-1047.
19. Brown SE, Mandelin E, Oehninger S, Toner JP, Seppala M and Jones HW Jr (2000) Endometrial glycodeclin-A expression in the luteal phase of stimulated ovarian cycles. *Fertil Steril* 74,130-133.
20. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA and Yoshinaga K (2000) Embryo implantation, *Dev Biol* 223,217-237.
21. Lim H, Song H, Paria BC, Reese J, Das SK and Dey SK (2002) Molecules in blastocyst implantation: uterine and embryonic perspectives. *Vitam Horm* 64,43-76.

22. Guidice LC (2003) Elucidatin endometrial function in the post-genomic era. Hum Reprod Update 9,223-235.
23. Psychoyoys A (1994) The implantation window; basic and clinical aspects. In Mori etl al. (eds) Perspectives on Assisted Reproduction. Ares-Serono Symposium 4, Roma, 1994, pp 57-63.
24. Navot D, Scott RT, Droesch K, Veeck LL, Liu HC and Rosenwaks Z (1991) The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. Fertil Steril 55,114-118.

## **Pareceres**

## **Grupo 1**

### **A técnica Pro-Drug combinando o adHSVtk e a droga GCV como uma estratégia de terapia gênica**

#### **Proposta:**

O projeto pretende, por meio dos métodos Suicide Gene Therapy e Pro-Drug, criar uma vacina gênica contra o câncer de próstata, de mama e de colo de útero, com o uso de um vetor adenoviral. Este vetor receberá, por co-transfecção, o gene HSVtk, codificador de timidina quinase, do vírus Herpes simplex. O vetor modificado se replicará apenas em células tumorais devido ao seu tropismo e a expressão da enzima em análise ativará o pró-fármaco Ganciclovir (GCV), o qual compete com dGTPs e, assim, impede a síntese de DNA em células tumorigênicas.

#### **Viabilidade:**

Uma vez que o projeto é de grande relevância para a saúde humana e de prático desenvolvimento, ele provavelmente terá seus objetivos alcançados. Entretanto, para a verificação da relação entre o fármaco Ganciclovir e a apoptose (terapia gênica direta), seria mais interessante que o grupo realizasse um microarranjo envolvendo genes de células tumorais infectadas com o vírus contendo o gene ativador da droga e células contendo o vírus, porém, sem o gene ativador.

#### **Relevância:**

O projeto em discussão é bastante relevante pois, por meio de métodos de uso comum e prático em laboratórios de biologia molecular, objetiva a criação de uma terapia, já funcional para câncer de cérebro, para outros tipos de oncogenia, como a de próstata, mama e colo de útero.

## **Grupo 2**

### **Transcrição gênica de RNA mensageiro ligados a tigmomorfogênese em *Arabidopsis thaliana***

#### **Proposta:**

Obter informações sobre a diferença da expressão gênica de gemas apicais e laterais de plantas sobre estresse mecânico ou não (controle).

#### **Viabilidade:**

A extração do RNA da gema apical e lateral de plantas sob estresse mecânico e do grupo controle e sua posterior análise por meio de microarranjo mostra-se adequada para o estudo da tigmomorfose. Mediante esta metodologia o objetivo proposto pelo grupo revela-se bem estabelecido e plenamente alcançável.

#### **Relevância:**

O projeto em questão é relevante pois a partir dele poderá se direcionar a criação de plantas com determinadas características, como por exemplo, tronco mais alto ou mais ramificado.

### **Grupo 3**

## **Estudo sobre a variação da expressão da hBD-2 e hBD-3 em queratinócitos expostos ao fungo *Malassezia furfur***

### **Proposta:**

O principal objetivo do trabalho é analisar a expressão da variação da expressão gênica em queratinócitos expostos ao fungo *Malassezia furfur*. O grupo também propõe fazer um western blotting das proteínas b-defensinas de modo a descobrir se a proteína é traduzida na célula durante a exposição ao fungo *M.furfur*.

### **Viabilidade:**

O projeto possui uma linha de trabalho bem estruturada, dominando bem as técnicas e metodologias que a pesquisa envolve. O cronograma é viável e bastante razoável quando comparado a cronogramas de projetos semelhantes. A única falha é que o orçamento é bastante impreciso e caro, o que reduz em muito a procedência do projeto, uma vez que ele já não gerará muitos dados interessantes e poucos deles serão de larga utilização tanto pela ciência como pela indústria farmacêutica.

### **Relevância:**

O fungo *malassezia furfur* faz parte de microbiota natural da pele, mas pode causar diversas doenças cutâneas como dermatite atópica, foliculite, dermatite seborréica e pitiríase versicolor. Apesar de já existirem tratamento para essas enfermidades o estudo proposto sobre as proteínas hb-2 e hb-3 pode ser revelante no campo para descobrir formas de tratamento de várias outras doenças microbianas, principalmente aquelas causadas por microorganismos aeróbicos.

Outra abordagem proposta é o estudo da interação da microbiota cutânea com a pele através dos níveis de expressão de hb-2 e hb-3.

Pode-se concluir que o objetivo principal do trabalho é de pouca relevância, uma vez que não representará nenhum avanço significativo numa área que já não requer muitos estudos. Porém, essa pesquisa tem potencial para obter dados interessantes sobre proteínas que parecem bastante ligadas com o controle da microbiota da pele e poderão trazer pistas para a criação de novas formas de tratamento de várias doenças cutâneas, além de informações sobre estética.

## **Grupo 4**

### **Desenvolvimento de Eucaliptos transgênicos para recuperação de áreas contaminadas por materiais pesados**

#### **Proposta:**

O grupo 4 procura, por meio da criação de eucaliptos transgênicos, recuperar solos contaminados com metais pesados. O princípio do método consiste na introdução de um gene responsável na síntese de fitoqualtina, que desempenha a função de captar e reter, em toda a planta, os metais pesados existentes no solo contaminado.

#### **Viabilidade:**

Esse trabalho, porém, levanta sérias questões. Sabendo-se que os metais pesados são retirados do solo e armazenados em toda a planta, a entrada desses metais na cadeia alimentar poderia gerar um problema maior do que o estado anterior daquele ambiente, uma vez que eles são altamente prejudiciais à integridade fisiológica dos animais e possui efeito acumulativo. Além disso, o desfolhamento dos eucaliptos em questão e a posterior decomposição das folhas levariam a recontaminação do solo. Outro fator importante é a utilização da madeira retirada das plantações, já que essas, por estarem contaminadas, não



poderão ser utilizadas em caldeiras e nem mesmo como móveis. Além disso, não se tem garantia de que tal prática levará à “cura do solo” no primeiro plantio, sendo provável a necessidade de vários ciclos de plantios que levará a um grave esgotamento do solo, o que será agravado pelo impedimento da utilização dos restos da plantação anterior como adubo, por estarem contaminados.

Concluimos, portanto, que o alcance dos objetivos citados não será fácil, uma vez que contornar os impactos ambientais que tal prática poderia causar consistirá em um problema muito maior do que a própria criação da linhagem transgênica.

### **Relevância:**

Tal prática teria o potencial, segundo os autores, de diminuir a contaminação de lençóis freáticos e reduzir o desmatamento de matas nativas, uma vez que haveria o surgimento de áreas descontaminadas, propícias à atividade comercial da terra; portanto o projeto é bastante relevante.

## **Grupo 5**

### **Aspectos peculiares da leucemia em crianças com síndrome de Down:**

#### **Proposta:**

Crianças com síndrome de Down tem 20% a mais de chance de desenvolver a leucemia do que crianças normais, no entanto respondem melhor aos quimioterápicos como o Aracetim. Uma das possíveis causas é que o gene codificante da enzima que responde ao medicamento esteja presente no cromossomo 21 e, como as crianças com síndrome de Down possuem três desse cromossomo, produziriam maior quantidade da enzima, tendo uma melhor resposta.

A proposta é investigar a diferença entre o proteoma de crianças leucêmicas normais e com a síndrome de Down, além da diferença entre crianças leucêmicas

com síndrome de Down antes e depois de submetidas à quimioterapia. Pretende-se contribuir na busca de melhores tratamentos e resposta aos medicamentos.

**Viabilidade:**

O projeto é viável. Trabalhará com medulas de pacientes leucêmicos cadastrados no REDOME. As medulas de pacientes não leucêmicos, que poderiam ser difíceis de conseguir, serão cedidas pelo CEMO. As células dessas medulas serão clonadas, de modo que se tenha um bom estoque e não precise recorrer a mais doações. Propõe o uso de técnicas já bem conhecidas para identificar o proteoma: será feita uma centrifugação diferencial para excluir as porções nucleares e membranosas. As amostras serão comparadas utilizando géis bidimensionais realizando depois uma espectrometria de massa. São metodologias bem conhecidas e relativamente simples. Trará grande benefício se colocado em prática.

**Relevância:**

O projeto é relevante, uma vez que pode dar uma grande contribuição para o entendimento da leucemia em crianças e, conseqüentemente, proporcionar um avanço médico-farmacêutico no desenvolvimento de novos fármacos e tratamentos, dando esperança e maior chance de cura a milhares de crianças.

## **Avaliação do efeito do tratamento com Kefir na microbiota e na expressão gênica das Células epiteliais do intestino de camundongos.**

### **Proposta:**

O grupo 7 visa avaliar o efeito do tratamento com Kefir como pró-biótico na microbiota do intestino. Além disso o grupo fará um microarranjo de células epiteliais de intestino de camundongo para comprovar suas análises. Também pretende quantificar comparativamente material genético de microbiota intestinal de camundongos tratados e não tratados com Kefir, tendo como base *Bifidobacterium* spp, *E. coli*, *C. difficile*, grupo *B. fragilis*, *Lactobacillus* spp e bactérias totais, através de Real-Time PCR.

### **Viabilidade:**

O projeto é bastante viável pois por meio de técnicas de fácil manejo realizará uma pesquisa de grande relevância em um espaço de tempo bastante desejado.

### **Relevância:**

Existem referências na literatura de que o consumo de kefir aumentava a longevidade do povo caucasiano e de que ele atua, também, sobre problemas intestinais. É lhe atribuído o melhor funcionamento intestinal devido às suas propriedades probióticas, a pesar de não existirem muitos trabalhos nesse campo.

A avaliação da microbiota e o estudo da alteração da expressão gênica de epitélio intestinal de camundongos alimentados com kefir traria novas pistas sobre a efetividade do probiótico no tratamento de desordens enterológicas trazendo um respaldo científico em relação ao seu uso. O projeto também seria de grande serventia para entender os mecanismos de ação do kefir, principalmente sobre a expressão gênica do tecido epitelial intestinal.

## **Grupo 8**

### **Construção de Bactérias Verde Fluorescente Para Uso Didático**

#### **Proposta:**

O projeto propõe a produção de bactérias fluorescentes para uso didático. Para isto o grupo usaria *Escherichia coli* gram negativa. Insetos de fragmentos do gene GFP, que é um gene de alga fluorescente, seria inserido no plasmídeo dessas bactérias através do vetor 322. Seria usada a mesma enzima de restrição para cortar o DNA do vetor, e o DNA plasmidial da bactéria que irá receber o fragmento, formando pontas coesivas. O inserto seria colocado nas bactérias por meio de transformação química. Uma vez implantado o fragmento de DNA exógeno na bactéria, esta irá produzir proteínas que fazem com que a bactéria se torne fluorescente. Estas bactérias seriam plaqueadas para isolamento de colônias.

#### **Viabilidade:**

Desde que a bactéria que irá receber o gene GFP seja uma bactéria competente para esse gene, ela poderá produzir proteínas GFP, que são proteínas que fazem com que a bactéria se torne fluorescente.

#### **Relevância:**

Além de viabilizar a observação de aspectos das bactérias, estas bactérias fluorescentes também poderiam ser usadas para uso didático em práticas de ensino.

