**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**“Perfil diferencial de microRNAs em células do *Cumulus*
oophorus de mulheres inférteis com e sem endometriose
submetidas à estimulação ovariana”**

Liliane Fabio Isidoro da Silva

RIBEIRÃO PRETO

2017

Liliane Fabio Isidoro da Silva

**“Perfil diferencial de microRNAs em células do *Cummulus oophorus* de
mulheres inférteis com e sem endometriose submetidas à estimulação
ovariana”**

Tese apresentada ao Departamento de Ginecologia
e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor
em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador (a): Professora Doutora Paula Andrea
de Albuquerque Salles Navarro

Co-orientadora: Dra Juliana Meola Lovato

RIBEIRÃO PRETO

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Liliane Fabio Isidoro da

“Perfil diferencial de microRNAs em células do *Cummulus oophorus* de mulheres inférteis com e sem endometriose submetidas à estimulação ovariana”

152 pg

Tese para título de Doutor apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientadora: Navarro, Paula Andrea de Albuquerque Salles.

Co-orientadora: Dra Juliana Meola Lovato

1. Endometriose. 2. Infertilidade feminina. 3. MicroRNAs. 4. Células do cumulus. 5. Qualidade oócitaria. 6. Estresse oxidativo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Liliane Fabio Isidoro da Silva

Perfil diferencial de microRNAs em células do *Cumulus oophorus* de mulheres inférteis com e sem endometriose submetidas à estimulação ovariana.

Tese apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.
Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador (a): Professora Doutora Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

Banca examinadora:

Profa. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr Wilson Araujo da Silva Junior

FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr Júlio César

FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis

FM – UFMG Assinatura: _____

Prof. Dr. Eduardo Shor

UNIFESP Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, José e Edilaine:

*Vocês me transmitiram importantes valores: o **R**espeito, a **H**onestidade, o*

***P**erdão, a **P**ersistência, a **A**mizade e o **A**mor a minha grande família.*

AMO MUITO VOCES!

Agradecimentos

A Deus, pelo conforto, amparo e força.

Aos meus pais e ao meu irmão Guilherme, que sempre estiveram ao meu lado, incentivando, apoiando e encorajando. Obrigada por compreenderem minha ausência, acreditarem no meu sonho, apoiarem nos momentos difíceis e fazerem todo o esforço valer a pena.

A minha orientadora, Profa. Dra. Paula Navarro e a minha co-orientadora Dra Juliana Meola Lovato, por terem me proporcionado tamanho crescimento pessoal e profissional. Obrigada pela oportunidade, pelo suporte, pela atenção, confiança e preocupação sempre a mim dedicados.

A grande colaboradora Caroline Mantovani, o meu muito obrigada pelo auxílio na execução deste projeto, pelo apoio em todos os momentos e pela dedicação.

Agradeço a Michele Da Broi e a Vanessa Sig pelas sugestões e correções feitas durante o trabalho, as quais contribuíram para o meu crescimento profissional.

Às funcionárias do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia – Setor de Reprodução Humana – HC-FMRP-USP, pelo carinho e apoio.

Ao Laboratório Multiusuário da FMRP-USP, especialmente a Lilian Eslaine Costa Mendes da Silva, técnica do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular, pelo aconhimento, pelas palavras de apoio e incentivo e pelo treinamento.

À secretária Suelen Soares pela amizade e constante auxílio.

Aos meus colegas de pós-graduação, por todo o companheirismo e apoio.

*Aos meus amigos Manuele, Felipe e Paula que sempre me apoiaram e estavam ao meu lado
em todos os momentos.*

*À CAPES- Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior pela concessão da
bolsa de doutorado (2013-2017).*

*Aos componentes da banca avaliadora, Prof. Dr. Eduardo Schor, Prof. Dr. Fernando Marcos
dos Reis, Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani e Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior,
pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições.*

*Especialmente a todas as pacientes que aceitaram participar do estudo e doaram amostras
das células do cumulus.*

Agradecimento Especial

À Dra Juliana Meola Lovato

Que tornou viável a conquista dos meus objetivos e sonhos, que me fortaleceu para ultrapassar os obstáculos impostos no meu caminho e, acima de tudo, muito compreensiva com minhas dificuldades.

Agradeço a você pelas sugestões e correções feitas durante o trabalho, as quais contribuíram para o meu crescimento profissional.

Muito obrigada!

Epígrafe

Certeza!!!

De tudo ficaram três coisas...

A certeza de que estamos começando...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...

Façamos da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro!

(Fernando Pessoa)

Resumo

SILVA, LFI. **Perfil diferencial de microRNAs em células do *Cummulus oophorus* de mulheres inférteis com e sem endometriose submetidas à estimulação ovariana.**

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Questiona-se um possível papel deletério da endometriose sobre a qualidade oocitária (QO), que é, em grande parte, condicionada pelo papel das células do cumulus. A função dessas células envolve a expressão de diversas moléculas codificadas por genes específicos, regulada a nível de transcrição, pós-transcrição e tradução. Os microRNAs atuam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica, de modo que qualquer alteração nesse mecanismo pode levar a anormalidades no desenvolvimento oocitário. Desta forma, propusemos um estudo inédito da análise de microRNAs em células do cumulus (CC) de mulheres inférteis com e sem endometriose com o objetivo de evidenciar processos biológicos e vias de atuação correlacionados com o papel da endometriose na infertilidade e seu possível impacto na aquisição da competência oocitária. Foram incluídas no estudo 15 pacientes inférteis (5 controles com fator tubário e/ou masculino, 5 com endometriose estágios I/II e 5 com endometriose estágios III/IV) submetidas à estimulação ovariana controlada (EOC) para injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Imediatamente após a captação oocitária, as CCs foram isoladas e armazenadas para extração dos miRNAs. O perfil de 754 miRNAs foi analisado por meio da técnica de TaqMan® Array Human MicroRNA Cards. Considerou-se significativo $p < 0,05$. Os miRNAs hsa-let-7f-1#, hsa-miR-1291, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-218, hsa-miR-30b e hsa-miR-629-5p foram identificados menos expressos nas pacientes com endometriose I/II comparadas às controles. Os miRNAs hsa-miR-1291, hsa-miR-187-3p, hsa-miR-30b, hsa-miR-532-3p e hsa-miR-629-5p foram identificados menos expressos nas pacientes com endometriose III/IV em relação às controles. Ao comparar-se os grupos endometriose I/II e endometriose III/IV entre si, os miRNAs hsa-miR-187-3p e hsa-miR-532-3p foram menos expressos e os miRNAs hsa-let-7f-1# e hsa-miR-362-3p mais expressos nas pacientes com endometriose III/IV. A análise de enriquecimento identificou os genes regulados pelos miRNAs e as respectivas vias metabólicas em que estão envolvidos, sugerindo aumento de apoptose, diminuição de proliferação celular, alterações no controle do ciclo celular e no metabolismo energético das CCs de mulheres com a doença inicial e avançada. Os dados apontam para alterações na regulação pós-transcricional em CCs de mulheres inférteis com endometriose inicial e avançada, o que pode afetar processos e vias essenciais à aquisição de

competência oocitária e estar envolvido na infertilidade associada à doença. Este estudo contribui para o entendimento da etiopatogênese da infertilidade relacionada à endometriose identificando mecanismos pós-transcricionais relacionados à piora da qualidade gamética nestas mulheres.

Palavras-chave: Endometriose; infertilidade; microRNAs, células do cumulus; perfil de expressão gênica.

Abstract

SILVA, LFI. Differential profile of microRNAs in Cumulus oophorus cells from infertile women with and without endometriosis submitted to ovarian stimulation.

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

It is questioned a possible deleterious role of endometriosis on oocyte quality (OQ), which is largely conditioned by the function of cumulus cells. The role of these cells involve the expression of several molecules encoded by specific genes, regulated at transcription level, post-transcription and translation. The microRNAs act as transcriptional regulators of gene expression, thus any alteration in this mechanism can lead to abnormalities in oocyte development. In this way, we proposed an unpublished study of the microRNAs analysis in cumulus cells (CC) of infertile women with and without endometriosis, aiming to evidence the biological processes and pathways of action correlated with the presence of endometriosis in infertility and its possible impact on the acquisition of oocyte competence. Fifteen infertile patients (5 controls with tubal factor and/or male, 5 with stage I/II of endometriosis and 5 with stages III/IV of endometriosis) submitted to the controlled ovarian stimulation (EOC) for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) were included in the study. Immediately after oocyte uptake, CCs were isolated and stored for miRNA extraction. The 754 miRNAs profile was analyzed using the TaqMan®Array Human MicroRNA Cards technique. Significant values were considered when $p < 0.05$. The hsa-miR-218, hsa-miR-301 and hsa-miR-629-5p miRNAs were identified as less expressed in the patients with endometriosis I/II compared to controls. The miRNAs hsa-miR-1291, hsa-miR-187-3p, hsa-miR-30b, hsa-miR-532-3p and hsa-miR-629-5p were identified as less expressed in patients with endometriosis III/IV compared to controls. Comparing the groups with endometriosis I/II and endometriosis III/IV, hsa-miR-187-3p and hsa-miR-532-3p miRNAs were less expressed and hsa-let-7f-1# and hsa-miR-362-3p more expressed in patients with endometriosis III/IV. The enrichment analysis identified the genes regulated by the miRNAs and the respective metabolic pathways in which they are involved, suggesting apoptosis increase, decreased cell proliferation, alterations in the cell cycle control and energetic metabolism of the CCs of women with initial and advanced disease. The data point to changes in post-transcriptional regulation in CCs of infertile women with early and advanced endometriosis, which may affect processes and pathways essential for acquiring oocyte competence and resulting in infertility associated with the disease. This study contributes to the understanding of the etiopathogenesis of infertility related to endometriosis

by identifying post-transcriptional mechanisms related to the deterioration of quality of gametes in these women.

Keywords: Endometriosis; infertility; microRNAs, cumulus cells; gene expression profile.

Lista de figuras

Figura 1. MicroRNAs analisados no experimento TaqMan®Array Human MicroRNA Cards A.....	35
Figura 2. MicroRNAs analisados no experimento de TaqMan®Array Human MicroRNA Cards B.. ..	36
Figura 3. Fluxograma do Estudo.	41

Lista de tabelas

Tabela 1. Caracterização clínica, resposta à estimulação ovariana controlada e resultados de ICSI de pacientes inférteis controles, com endometriose pélvica I/II e endometriose III/IV	42
Tabela 2: Perfil diferencial de microRNAs expressos em CCs de mulheres inférteis com endometriose.....	44
Tabela 3: Vias gênicas relacionadas a comparação controle versus endometriose estágios I/II reguladas pelos microRNAs desregulados (hsa-lef-7f-1#, hsa-miR-1291, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-218 hsa-miR-30b e hsa-miR-629-5p).....	45
Tabela 4: Vias gênicas relacionadas a comparação controle versus endometriose estágios III/IV reguladas pelos microRNAs desregulados (hsa-miR-1291, hsa-miR-187-3p, hsa-miR-30b, hsa-miR-532-3p e hsa-miR-629-5p)	47
Tabela 5: Vias gênicas relacionadas a comparação controle versus endometriose estágios I/II e controle versus endometriose estágios III/IV reguladas pelos microRNAs desregulados (hsa-miR-1291, hsa-miR-30b e hsa-miR-629-5p).....	48
Tabela 6: Vias gênicas dos genes de interesse relacionadas a comparação endometriose estágios I/II versus endometriose estágios III/IV relacionados aos microRNAs (let-7f-1# e hsa-miR-362-3p).....	49
Tabela 7: Descrição das vias metabólicas relacionadas aos genes-alvo dos microRNAs (miRNAs)	50

Lista de siglas

ATP: Adenosina trifosfato

C: controle

CC: Células do *cumulus*

cDNA: DNA complementar

DAVID: *Database for annotation, visualization and integrated Discovery*

DNA: Ácido desorirribonucleico

EOC: Estimulação ovariana controlada

ESHRE: *Special Interest GRoup for Endometriosis and Endometrium*

FF: Fluído folicular

FIV: Fertilização *in vitro*

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

FSH: Hormônio folículo estimulante

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofina

hCG: Gonadotrofina coriônica humana

HCRP: Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

HIV: Vírus da imuno deficiência humana

HTF: meio de cultura Human Tubal Fluid-HEPES

IQ: Intervalo interquartil

ICSI: Injeção intracitoplasmática de espermatozoides

IMC: Índice de massa corporal

KEGG: *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*

LUF: Síndrome do folículo não roto

LH: Hormônio lteinizante

miRNA: **MicroRNA**

QO: Qualidade oocitária

RNA: Ácido ribonucleico

RNA-Seq: Sequenciamento de nova geração de RNA mensageiro

ROS: Espécies reativas de oxigênio

TRA: Técnicas de reprodução assistida

USTV: Ultrassonografia transvaginal

VLPS: Videolaparoscopia

OC: oócito cumulus

PCR - Reação em cadeia da polimerase

cDNA : DNA complementar

RA: Reprodução assistida

RQ: nível de expressão

2- $\Delta\Delta$ CT (ou 2-Ct): dois - delta delta Ct

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Endometriose	19
1.2. Endometriose e infertilidade	19
1.3. Qualidade oocitária	21
1.4. Células da granulosa/cumulus e endometriose	21
1.5. Células do cumulus e expressão gênica	23
1.6. MicroRNAs e CCs	24
2. OBJETIVOS.....	27
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	29
3.1. Desenho do estudo, contexto e considerações éticas	29
3.2. Pacientes	29
3.3. Protocolo de Estimulação Ovariana e Suplementação de Fase Lútea	30
3.4. Captação Oocitária.....	31
3.5. Células do Cumulus oophorus	32
3.6. ICSI e avaliação da qualidade embrionária	32
3.7. Isolamento RNA total	33
3.8. Transcrição Reversa.....	33
3.9. Pré-Amplificação do cDNA.....	33
3.10. PCR em Tempo Real Quantitativo (qPCR) de microRNA.....	34
3.11. Análise estatística.....	37
3.12. Análise de enriquecimento	38
4. RESULTADOS	40
4.1. Fluxograma do estudo.....	40
4.2. Caracterização dos grupos	42
4.2.1. Controle versus endometriose estágios I/II:	44
4.2.2. Controle versus endometriose estágios III/IV	46
4.2.3. Micros comuns das comparações controle versus endometriose estágios I/II e controle versus endometriose estágios III/IV	47
4.2.4. Endometriose estágios I/II versus endometriose estágios III/IV	48
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
8. ANEXOS.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. Endometriose

A endometriose é um distúrbio ginecológico dependente de estrogênio que afeta 6-10% das mulheres em idade reprodutiva (Eskenazi, *et al.*, 1997). Caracteriza-se por implante e crescimento de tecido endometrial (glândulas e/ou estroma) fora da cavidade uterina, principalmente no peritônio pélvico, ovários e septo reto-vaginal. Pode apresentar quadro clínico bastante diversificado, variando desde assintomático, até caracterizado pela presença de dor pélvica crônica, dismenorréia, dispareunia, sangramento uterino anormal e infertilidade (Giudice e Kao, 2004, Bulun, 2009). Tanto por seu impacto na saúde física e psicológica, como pelo impacto sócio-econômico diante dos custos para o seu diagnóstico e tratamento, a endometriose tem sido considerada um problema atual de saúde pública (Signorile e Baldi, 2010).

A etiopatogenia da endometriose é ainda não completamente esclarecida, havendo diversas teorias e hipóteses tentando justificar a origem desta enigmática doença. De modo geral, há teorias propondo que os implantes se originam do endométrio uterino e outras sugerindo que os implantes surgem de tecidos extra-uterinos (Burney e Giudice, 2012). Intrinsecamente a estas teorias têm sido estudados fatores desencadeadores e potencial susceptibilidade genética, cujos papéis estão começando a ser delineados, apesar de, até o presente, estarem insuficientemente estabelecidos para confirmar uma relação causa-efeito no desenvolvimento da doença.

1.2. Endometriose e infertilidade

Um aspecto muito interessante em portadoras de endometriose é a sua enigmática associação com a infertilidade. A doença está presente em 25 a 40% das mulheres inférteis, sendo que 30 a 50% das portadoras de endometriose têm dificuldade em ter filhos (Holoch e Lessey, 2010). Até o presente momento, pouco é conhecido acerca dos mecanismos envolvidos na etiopatogênese da infertilidade relacionada a esta doença, especialmente nos casos de endometriose mínima e leve, em que não se observam alterações significativas da anatomia pélvica.

As técnicas de reprodução assistida (TRA) de alta complexidade têm sido cada vez mais aplicadas na abordagem terapêutica da infertilidade relacionada a esta afecção. A introdução da fertilização *in vitro* (FIV) no tratamento da infertilidade secundária à endometriose tornou-se

uma importante ferramenta para o estudo dos efeitos potenciais da endometriose em alguns estágios específicos do processo reprodutivo, incluindo a foliculogênese, a fertilização, o desenvolvimento embrionário e a implantação.

Se por um lado há evidências de associação entre endometriose e infertilidade, por outro, encontramos resultados controversos acerca dos resultados da FIV em pacientes com endometriose, o que vem sendo foco de diversos estudos e hipóteses nos últimos anos (García-Velasco e Arici, 1999; Garrido *et al.*, 2000; Barnhart *et al.*, 2002; Al-Fadhli *et al.*, 2006; Opoien *et al.*, 2012; Harb *et al.*; 2013, Barbosa *et al.*, 2014; Senapati *et al.*, 2016). Resultados conflitantes de alguns estudos têm sugerido a ocorrência de menores taxas de implantação e gestação em portadoras de endometriose, que poderiam ser decorrentes do comprometimento da qualidade oocitária e, conseqüentemente, embrionária, de defeitos endometriais e/ou anomalias da interação entre o endométrio e o embrião (Barnhart *et al.*, 2002; Al-Fadhli *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2012).

Os achados conflitantes da presença de algumas alterações no endométrio eutópico de pacientes com endometriose, poderiam explicar, pelo menos em parte, distúrbios na interação entre o embrião e o endométrio, gerando anomalias no processo de implantação (García-Velasco e Arici, 1999; Simón, 2000). Contudo, o achado de taxas de implantação semelhantes em mulheres com e sem endometriose que receberam oócitos de doadoras saudáveis, tem reforçado o papel crucial da qualidade embrionária no comprometimento da implantação verificado neste grupo de pacientes (Brizek *et al.*, 1995; Pellicer *et al.*, 1995; Garrido *et al.*, 2000; Pellicer *et al.*, 2001; Katsoff *et al.*, 2006). O comprometimento da qualidade embrionária pode ser induzido tanto por defeitos relacionados à foliculogênese e qualidade oocitária, como por eventos posteriores à fertilização. Neste contexto, alguns autores sugerem alterações na qualidade do oócito como responsáveis pelo comprometimento (Brizek *et al.*, 1995) ou completo bloqueio do desenvolvimento embrionário (Pellicer *et al.*, 1995) em mulheres com endometriose quando comparadas a controles saudáveis, reforçando o papel da piora da qualidade oocitária nos resultados dos procedimentos de reprodução assistida nestas pacientes.

Sabemos que embriões de boa qualidade (aqueles com habilidade para implantar e desenvolver adequadamente), originam-se de oócitos de boa qualidade, que, por sua vez, são provenientes de folículos com um adequado meio ambiente, condicionado tanto pelo conteúdo do fluido folicular, como pela influência das células vizinhas (Canipari *et al.*, 2000; Gilchrist, 2011).

1.3. Qualidade oocitária

A qualidade oocitária resulta de um complexo e sincronizado processo de desenvolvimento que tem duração de vários meses, desde a fase de folículo primordial até a fase de folículo pré-ovulatório (Pellicer *et al.*, 1998; Garrido *et al.*, 2002). Os folículos que iniciam esse processo o fazem inicialmente de modo gonadotrofina-independente e, posteriormente, gonadotrofina-dependente. Nessa última fase, oócito, células da granulosa e FSH interagem de forma sinérgica e a multiplicação das células da granulosa e o modo como respondem ao FSH e, posteriormente, ao LH para a produção de esteróides intra-foliculares são eventos fundamentais desse processo (Speroff e Fritz, 2005). Sabe-se que existem *gap-junctions* entre as células da granulosa e entre essas e o oócito (Furger *et al.*, 1996), havendo, assim, interação através de moléculas sinalizadoras como o GDF-9 (fator de diferenciação de crescimento 9) e o BMP-15 (proteína óssea morfogenética-15) (Albertini e Barrett, 2003; Combelles *et al.*, 2004; Thomas e Vanderhyden, 2006; Hutt e Albertini, 2007). Existem evidências de que as células do cumulus (CCs) contribuem para o processo de maturação citoplasmática oocitária (Tanghe *et al.*, 2002) através da rede de *gap junctions* entre as próprias células do cumulus e entre essas e o oócito (Albertini, 2003; Combelles *et al.*, 2004. Thomas e Vanderhyden, 2006; Hutt e Albertini, 2007). Além disso, a presença das CCs é importante para que ocorra a fertilização (Tanghe *et al.*, 2002) por atraírem espermatozóides selecionados e promoverem sua capacitação e penetração (Eisenbach, 1999). Por outro lado, deve-se enfatizar que as CCs protegem os oócitos de entrarem em apoptose induzida por estresse oxidativo (Tatemoto *et al.*, 2000), que ocorre quando há uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou nitrogênio (ERN) em relação aos antioxidantes disponíveis (Halliwell B., 2007). Alguns estudos sugerem que a análise das CCs possa ser utilizada como preditor indireto da qualidade oocitária e dos resultados dos procedimentos de reprodução assistida, o que poderia ter distintas aplicações clínicas (Hamamah *et al.*, 2006; Assou *et al.*, 2006, 2008; Hamel *et al.*, 2008; Tesfaye *et al.*, 2009; Haouzi e Hamamah, 2009).

1.4. Células da granulosa/cumulus e endometriose

Alguns estudos evidenciam incidência aumentada de síndrome do folículo luteinizado não roto (LUF) e defeitos de fase lútea em mulheres com endometriose (Cheesman *et al.*, 1983; Holtz *et al.*, 1985; Saracoglu *et al.*, 1985; Kaya e Oral, 1999). Alguns dados demonstram um

defeito da esteroidogênese das células da granulosa associado à endometriose, representada não apenas pela redução da atividade basal da aromatase, mas também pela menor produção de progesterona tanto em ciclos estimulados quanto não estimulados (Harlow *et al.*, 1996). Desse modo, a disfunção ovulatória resultante da secreção alterada de esteróides ovarianos ou da função lútea inadequada pode ser importante na patogênese da infertilidade associada à endometriose. Um defeito funcional do oócito devido à função folicular anormal pode ser resultado dessa disfunção ovulatória (Wardle *et al.*, 1985).

A aromatase está presente nas células da granulosa e, de fato, exerce um papel fundamental para o processo de maturação folicular e estabelecimento da qualidade oocitária (Erickson *et al.*, 1989; Foldesi *et al.*, 1998; Speroff e Fritz, 2005). Estudos *in vitro*, de cultivo de células da granulosa de mulheres com endometriose submetidas a ciclos de hiperestimulação ovariana controlada demonstraram que essas apresentam um comprometimento na atividade da aromatase. Harlow e colaboradores (1996) pesquisaram a atividade da aromatase em pacientes com endometriose mínima e leve através de cultura de células da granulosa na qual avaliaram a produção de estrógeno frente à adição de testosterona ao meio de cultura. Estes autores encontraram redução da atividade da aromatase nas pacientes com endometriose em comparação ao controle. Pesquisadores do mesmo grupo (Cahill *et al.*, 2003) utilizando a mesma técnica, constataram uma menor sensibilidade ao LH nas células da granulosa de mulheres com endometriose.

Abreu e colaboradores (2006) encontraram redução na produção de estradiol nas células da granulosa murais luteinizadas *in vitro*, obtidas de mulheres com endometriose, após 24 horas de cultivo celular. Em outro estudo realizado por Abreu e colaboradores (2009) não se observou diferença na expressão gênica da aromatase (*CYP19A1*) em células murais luteinizadas de mulheres com endometriose e controles submetidas a técnica de reprodução assistida. Todavia, segundo Barcelos e colaboradores (2013) dados recentemente obtidos de nosso grupo, evidenciaram que a expressão do gene *CYP19A1*, codificante da aromatase, é significativamente menor nas células do *Cumulus oophorus* de mulheres inférteis com endometriose, quando comparadas a mulheres inférteis sem a doença, submetidas à estimulação ovariana para fertilização *in vitro*. Assim, sugere-se que o comprometimento da esteroidogênese ovariana participe da etiopatogênese da infertilidade relacionada à doença. Todavia, os mecanismos envolvidos na desregulação da esteroidogênese ovariana em portadoras de infertilidade relacionada à endometriose permanecem desconhecidos.

Se por um lado há indícios de que o comprometimento da esteroidogênese ovariana possa participar da etiopatogênese da infertilidade relacionada à endometriose, por outro também temos indícios de anomalias na foliculogênese e maturação oocitária relacionadas a esta doença (Barcelos *et al.*, 2008; 2009). Alguns autores apontam para um possível atraso na maturação do oócito (Barcelos *et al.*, 2009), assim como, para a presença de estresse oxidativo no microambiente folicular dessas mulheres (Andrade *et al.*, 2010; Da Broi *et al.*, 2016). Sabe-se que diversas moléculas são responsáveis pela comunicação precisa entre CCs, entre oócito e CCs, assim como, por sua defesa antioxidante, a fim de garantir um adequado desenvolvimento folicular com consequente ovulação de um oócito competente (Albertini *et al.*, 2003; Assou *et al.*, 2006). Estas moléculas são codificadas por genes específicos, cuja expressão deve ser coordenada a fim de promover as funções fisiológicas esperadas neste microambiente.

1.5. Células do cumulus e expressão gênica

Apesar de ainda ser pouco explorada, a avaliação da expressão gênica em CC de mulheres inférteis com endometriose tem sido utilizada em estudos que investigam os mecanismos envolvidos na infertilidade associada à doença. Nosso grupo foi pioneiro nesta temática, demonstrando maior expressão do gene *SOD1* em CC de pacientes inférteis com endometriose pélvica nos estádios avançados (III/IV), quando comparadas a pacientes inférteis sem endometriose e com endometriose pélvica em estádios iniciais (I/II). Estes resultados sugerem uma tentativa de prevenção ao dano oxidativo oocitário desencadeado pela doença (Donabela *et al.*, 2015). Há, também, evidência de menores níveis do gene que codifica a Ciclooxigenase-2 (*PTGS2*) nas CCs de mulheres inférteis com a doença, o que pode estar envolvido no comprometimento da qualidade oocitária em pacientes com endometriose (Da Luz, *et al.*, 2017). Allegra e colaboradores (2014) analisaram o perfil de expressão gênica em CC de mulheres com endometriose severa utilizando a técnica de microarray realizada com apenas um pool de amostras por grupo, controle e endometriose. Essa avaliação evidenciou genes desregulados e potencialmente associados à doença e à baixa taxa de fertilização de pacientes com endometriose (Allegra *et al.*, 2014). Em estudo recente, ao avaliar as CCs de mulheres com endometriose avançada com e sem endometrioma e controles inférteis através de sequenciamento de nova geração (RNA-Seq), nosso grupo evidenciou genes diferencialmente expressos entre os grupos, sugerindo fortemente alterações nas CCs dessas pacientes com possível prejuízo para o desenvolvimento oocitário (Da Luz, *et al.*, 2016).

1.6. MicroRNAs e CCs

O processo de expressão gênica é complexo e altamente controlado e regulado a nível de transcrição e tradução. Recentemente, tornou-se evidente que um grupo de genes não codificantes de proteínas também atuam como reguladores essenciais da estabilidade da expressão gênica (Ambros *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2006). Portanto, a regulação precisa desses genes não codificantes é crucial para a adequada expressão de seus genes-alvo.

Os miRNAs representam uma classe de RNAs não-codificantes que possuem de 18 a 24 pares de bases de nucleotídeos. Seu papel na regulação gênica consiste na sua ligação a uma pequena sequência correspondente a região não traduzida 3'(3'UTR) do RNAm alvo específico, ocasionando um bloqueio na tradução proteica ou a degradação do RNAm alvo (Ioio *et al.*, 2005). Uma vez que os miRNAs podem regular mais de um alvo, estimativas indicam que um único miRNA pode regular mais de 30% dos genes codificantes de proteína no genoma humano (Lewis *et al.*, 2005), comprovando sua importância como regulador global da expressão gênica.

Apesar de não terem suas funções totalmente esclarecidas, a descoberta dos miRNAs atraiu a comunidade científica pelas evidências sugestivas de que essas moléculas apresentam papel fundamental em diversos processos biológicos. Em mamíferos, esses pequenos RNAs foram associados à regulação da proliferação celular, apoptose, diferenciação celular, hematopoiese, entre outras funções (Chen *et al.*, 2005; Brennecke *et al.*, 2003; Esau *et al.*, 2004). Alterações em miRNAs já foram associadas com várias doenças humanas (Singh *et al.*, 2008), incluindo doenças ginecológicas benignas, neoplasias ginecológicas e problemas de fertilidade do trato reprodutivo feminino (Carletti e Christenson, 2009).

Nesse sentido, alterações nos mecanismos de regulação gênica dos microRNAs poderiam estar envolvidas na desregulação dos genes previamente identificados com expressão aberrante em CCs de mulheres inférteis com a doença. Considerando o microambiente folicular e as funções das CCs, qualquer alteração nos mecanismos de controle pós-transcricionais poderia levar a anormalidades no desenvolvimento dos oócitos, induzir apoptose e prejudicar a comunicação celular entre as células somáticas, afetando assim, o desenvolvimento e recrutamento dos folículos. Como mencionado anteriormente, mulheres com endometriose parecem ter uma fase folicular mais longa (Cahill *et al.*, 1997), uma taxa mais lenta de crescimento folicular (Doody *et al.*, 1998) e uma redução do folículo dominante (Tummon *et*

al., 1998), quando comparadas com mulheres inférteis sem causa aparente. Portanto, é possível que na endometriose a sequência dos eventos de maturação dos oócitos esteja comprometida pela expressão alterada de moléculas cruciais, o que poderia ser decorrente de uma regulação anormal exercida pelos microRNAs correspondentes, fato que precisa ser avaliado em estudos com metodologias pertinentes (Teague *et al.*, 2009).

Apesar de vários estudos tentarem buscar um perfil diferencial de expressão de miRNAs em tecidos endometriais eutópico e ectópico de mulheres com a doença através de análises de bioinformática e dados de *microarrays*, (Ohlsson *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2007)

Assim, determinar o perfil diferencial de miRNAs em células do *Cumulus oophorus* de pacientes inférteis com endometriose, submetidas à estimulação ovariana para a realização de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), pode ajudar a elucidar mecanismos moleculares envolvidos no comprometimento da qualidade oocitária relacionado à doença, assim como identificar biomarcadores de qualidade gamética e sucesso gestacional nessas pacientes.

Objetivos

2. OBJETIVOS

1°. Comparar a expressão de 754 microRNAs em células do *Cummulus* (CCs) entre mulheres inférteis controles (fatores masculino e/ou tubário de infertilidade), endometriose pélvica estágios I/II e estágios III/IV submetidas à estimulação ovariana para a realização de Técnicas de Reprodução Assistida de alta complexidade;

2°. Realizar uma análise *in silico* para enriquecimento das vias dos genes regulados pelos miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos e destacar as vias relacionadas à aquisição de competência oocitária possivelmente alteradas nas pacientes com a doença.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo, contexto e considerações éticas

Realizou-se um estudo caso-controle prospectivo de fevereiro de 2013 a maio de 2014. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP) -SP processo CAAE nº 10735012.8.0000.5440.

Foram incluídas consecutivamente no presente estudo todas as mulheres submetidas à estimulação ovariana para a realização de ICSI, junto ao Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, que preencheram os critérios de elegibilidade abaixo descritos e manifestaram o desejo de participar do projeto, mediante a assinatura do termo de consentimento pós-informado.

O estudo foi realizado junto ao Laboratório de Ginecologia - Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FMRP-USP e Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório Multiusuário, FMRP-USP.

3.2. Pacientes

As pacientes tiveram seus prontuários avaliados de acordo com os critérios de elegibilidade e as consideradas elegíveis foram contatadas para a realização do convite e da entrevista inicial. Ao concordarem em participar do estudo, as pacientes foram acompanhadas até a data da captação.

Foram consideradas elegíveis as pacientes com idade menor que 40 anos, FSH do terceiro dia do ciclo menstrual ≤ 10 mUI/mL, índice de massa corporal (IMC) menor ou igual 30 kg/m^2 , com ausência de doenças como diabetes mellitus ou quaisquer outras endocrinopatias, doença cardiovascular, dislipidemia, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças reumatológicas, ausência de infecção pelo vírus HIV ou qualquer infecção ativa, ausência de tabagismo ou o uso de medicações hormonais e antiinflamatórios hormonais e não-hormonais nos últimos seis meses, previamente à programação para o procedimento de reprodução assistida.

No grupo controle, foram incluídas as pacientes submetidas à estimulação ovariana para realização de injeção intracitoplasmática de espermatozóide, indicada pela presença exclusivamente de fator masculino e/ou fator tubário (excluindo-se a presença de hidrossalpinge) e ausência de quaisquer doenças pélvicas associadas à infertilidade, quando da realização da laparoscopia diagnóstica, utilizada como parte da propedêutica da investigação

de infertilidade. No grupo endometriose I/II e III/IV, foram incluídas as pacientes submetidas à estimulação ovariana para realização de injeção intracitoplasmática de espermatozóide, indicada pela presença exclusivamente de endometriose, com diagnóstico de endometriose e classificação do estágio da doença por videolaparoscopia realizada no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, segundo os critérios definidos pela *American Society for Reproductive Medicine* (1997) e com ausência de qualquer tratamento clínico ou cirúrgico para a endometriose nos últimos seis meses.

Para a caracterização clínica das pacientes foram coletados dados como: o tempo de infertilidade; número de óocitos captados, maduros, injetados e fertilizados; taxa de fertilização; número de embriões clivados, embriões formados e embriões transferidos.

3.3. Protocolo de Estimulação Ovariana e Suplementação de Fase Lútea

Com o objetivo de sincronizar e programar o início do ciclo de estimulação ovariana controlada foi utilizada a programação da menstruação, que consiste em se administrar anticoncepcionais orais combinados diariamente, iniciados no período menstrual do ciclo precedente até cinco dias antes do previsto para o início da estimulação ovariana.

A hiperestimulação ovariana controlada foi iniciada cinco dias após a interrupção dos contraceptivos orais combinados usados para a programação do ciclo. Todas as mulheres foram monitorizadas apenas por ultrassonografia transvaginal (UStv) (Martins *et al.*, 2014), submetidas ao protocolo flexível com antagonista do GnRH e a estimulação ovariana controlada realizada de acordo com um dos dois protocolos descritos a seguir:

- Protocolo flexível com antagonista e alfacorifolitropina (Elonva®, Schering-Plough, Brasil). Cinco dias após a interrupção do contraceptivo oral combinado foi administrada a alfacorifolitropina na dose de 100 mcg para pacientes com até 60kg e 150 mcg para pacientes com mais de 60kg. Seis dias após a administração da alfacorifolitropina foi realizado o primeiro UStv para monitorização do ciclo. O bloqueio hipofisário foi realizado com antagonista do GnRH (Cetrotid® ou Orgalutran®), iniciado quando havia um folículo com diâmetro médio maior ou igual a 14 mm e mantido até o dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Ovidrel®, Serono, Brasil). No oitavo dia após a administração da alfacorifolitropina, as pacientes que não apresentaram critério para uso do hCG recombinante, iniciaram o uso diário de gonadotrofinas (150-300 IU/dia), usadas até a véspera do dia de uso do hCG.

- Protocolo flexível com antagonista e FSH recombinante (FSHr) (Gonal-F®, Serono, Brasil; Puregon®, Organon, Brasil). Cinco dias após a interrupção do contraceptivo oral combinado foi administrado FSHr, 150 a 300 UI por dia, durante os seis primeiros dias da EOC. A partir do sétimo dia EOC, a dose foi ajustada de acordo com o crescimento folicular, monitorado com USTV diariamente ou em dias alternados e mantida até a véspera do dia de uso do hCG. O bloqueio hipofisário foi realizado com antagonista do GnRH (Cetrotid® ou Orgalutran®), iniciado quando havia um folículo com diâmetro médio maior ou igual a 14 mm e mantido até o dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Ovidrel®, Serono, Brasil).

Quando pelo menos dois folículos atingiram 17 mm de diâmetro médio, foi administrado 250 µg de hCG recombinante às 22:00. A captação dos oócitos foi realizada 34 a 36h após a administração do hCG recombinante.

A suplementação da fase lútea foi realizada com progesterona natural micronizada (Utrogestan®, Besins Healthcare, Brasil) por via vaginal na dose de 200mg, três vezes ao dia, a partir do dia da captação oocitária e mantida até a décima segunda semana da gestação, nas pacientes que engravidaram.

3.4. Captação Oocitária

A captação dos oócitos foi realizada mediante prévia anestesia geral endovenosa com propofol (Diprivan®, Astra-Zeneca, Brasil) associado a citrato de fentanil (Fentanil®, Janssen-Cilag, Brasil). A aspiração dos folículos por via endovaginal guiada por transdutor ultrassonográfico transvaginal, foi realizada utilizando-se uma agulha de lúmen simples padrão, com 300 mm de comprimento, 1,1 mm de diâmetro interno, duplo bixel cortante, ranhurado nos dois centímetros terminais para uma maior ecogenicidade (Laboratório CCD, França), com pressão aspirativa artificial constante de 100 mmHg, por meio de bomba de sucção com controle eletrônico (Craft® Suction Pump, Rocket Medical, Inglaterra). Os folículos foram aspirados em *pool*, ou seja, foi realizada a aspiração do maior número possível de folículos em cada punção, observando-se o esvaziamento completo de cada folículo e puncionando-se o ovário o menor número de vezes possível. A punção foi realizada sob aspiração contínua, tomando-se o cuidado de tirar a pressão durante a entrada e retirada da agulha na parede vaginal, para evitar aspiração de células vaginais.

Para a identificação e o isolamento dos complexos oócito-cumulus, o material aspirado foi transferido para placas de Petri com 10 cm de diâmetro, previamente aquecidas em platina térmica a 37°C, não contendo meio de cultivo. Depois de identificados, os complexos oócito cumulus (OC) foram isolados do fluido folicular (FF) e colocados em placa separada. Os complexos OC foram lavados cuidadosamente em meio de cultura Human Tubal Fluid-HEPES (HTF, Irvine Scientific), para a remoção de sangue e debris.

Todo o manuseio dos oócitos foi realizado em capela de fluxo laminar (Veco Modelo HLFS 12), com a finalidade de manter o meio estéril.

3.5. Células do Cumulus oophorus

Imediatamente após a identificação dos OC, os mesmos foram lavados cuidadosamente em meio de cultura Human Tubal Fluid-HEPES (HTF, Irvine Scientific), para a remoção de sangue e debris. As CC foram separadas do ovócito através de microdissecção com a utilização de duas agulhas de insulina, colocadas no criotubo com *RNAlater^R* Solution (Ambion) e após 24 horas à 4°C de imersão nesta solução, as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido até a sua utilização como descrito a seguir. As CCs de todos os OC obtidos de cada paciente eram armazenadas no mesmo criotubo.

3.6. ICSI e avaliação da qualidade embrionária

Os oócitos maduros foram submetidos à ICSI 3 a 4 horas após a captação de oócitos e depois de injetados, foram cultivados em gotas separadas. A fertilização foi avaliada aproximadamente 16-18 horas após ICSI, caracterizada pela presença de dois pronúcleos e dois corpúsculos polares. A qualidade embrionária foi analisada aproximadamente 43-45 horas após ICSI (segundo dia de desenvolvimento -D2), baseada no número e na simetria dos blastômeros, percentual de fragmentação e presença ou ausência de multinucleação. Nos casos em que a transferência embrionária não foi realizada em D2, a qualidade embrionária foi novamente analisada aproximadamente 67-69 horas após ICSI (D3) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). A transferência embrionária foi realizada em D2 ou D3 de acordo com as considerações individualizadas para cada caso.

Metodologias

3.7. Isolamento RNA total

O RNA total foi extraído de células do cumulus usando o mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion/ThermoFisher, USA), seguindo as instruções do fabricante (protocolo em anexo – ANEXO 2). Em seguida, foi realizada a quantificação por fluorimetria do RNA total no equipamento Qubit® Fluorometer utilizando o Qubit® RNA HS Assay Kit (Life thecnology/ThermoFisher Scientific, USA).

3.8. Transcrição Reversa

Foram realizadas duas sínteses de cDNA da mesma amostra com o conjunto de reagentes TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit e Megaplex™ RT Primers (Applied Biosystems/ThermoFisher Scientific, USA). Na primeira síntese utilizou-se um *pool* de *primers* A contendo 377 microRNAs alvos e 4 controles, e na segunda, um *pool* B contendo outros 377 microRNAs alvos e os mesmos 4 controles. Foi preparada uma reação contendo: 0,8µl Megaplex RT Primers A/B (10x), 0,20 µl dNTPs with dTTP (10mn), 1,50 µl Multi Scribe Reversa (75U), 0,80 µl 10x RT Buffer, 0,90 µl MgCl₂ (25mm), 0,10 µl RNase Inibitor, 0,20 µl água livre de nucleases e 3 µl da amostra (10 ng de RNA total). Logo em seguida, o mix de reação foi incubado por 5 minutos no gelo e submetido às seguintes condições de ciclagem: 40 ciclos de 16°C por 2 minutos, 42°C por 1 minuto e 50° por 1 segundo, 1 ciclo de 85°C por 5 minutos e 4°C infinito no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems/ThermoFisher Scientific, USA).

3.9. Pré-Amplificação do cDNA

A reação de pré-amplificação do cDNA foi realizada utilizando-se o conjunto de reagentes TaqMan® PreAmp Master Mix, Megaplex PreAmp Primers Human Pool A e Megaplex PreAmp Primers Human Pool B (Applied Biosystems/ ThermoFisher Scientific, USA). Para o preparo da reação utilizou-se os seguintes reagentes: 12,5 µl TaqMan PreAmp Master Mix (2x), 2,5 µl Megaplex PreAmp Primers A ou B (10x), 2,5 µl de água livre de nucleases e 7,5 µl de cDNA. Após a incubação do mix de reação por 5 minutos em temperatura ambiente, este foi submetido às seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, 55°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos, 12 ciclos de 95° por 15 segundos e 60°C por 4 minutos, 1 ciclo 99,9°C por 10 minutos e 4°C infinito no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems/ ThermoFisher Scientific, USA).

3.10. PCR em Tempo Real Quantitativo (qPCR) de microRNA

O TaqMan® Array Human MicroRNA Cards A e B abrange um total de 754 alvos específicos para microRNAs do genoma humano baseados no banco de dados do Sanger miRBase v14. Cada card (A ou B) contém 4 controles (3 controles enógenos candidatos - RNU44, RNU48, U6 e 1 controle negativo - ath-mir-159a) e 377 microRNAs alvos. As figuras 1 e 2 apresentam, respectivamente, o desenho dos *cards* A e B com o nome dos microRNAs analisados.

Para as reações de qPCR foram utilizados os seguintes reagentes: 450 µl de TaqMan® Universal Master Mix II no UNG (Applied Biosystems), 50 µl do produto da Pré – Amplificação A ou B na diluição de 1:4 e 400 µl de água livre de nucleases. Pipetou-se 100 µl deste preparo em cada um dos 8 reservatórios do *card*, e esta solução foi distribuída homogeneamente em cada poço por centrifugação a 1200 rpm por 1 minuto (3 vezes). A reação de amplificação dos microRNAs ocorreu na seguinte condição de ciclagem: 1 ciclo 95°C por 10 minutos, 40 ciclos 95°C por 15 segundo e 60°C por 1 minuto no equipamento ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems/ ThermoFisher Scientific, USA).

Os resultados de amplificação foram analisados no software Thermo Fisher Cloud. Como controle de qualidade do RNA foi utilizada como parâmetro a amplificação dos microRNAs RNU44, RNU48, U6 (variações de 12 a 18 Cts). Os microRNAs que apresentaram Cts (ciclo *threshold*) maiores ou iguais a 36 ciclos foram considerados como não detectados (Vandesompele *et al.*, 2009) e foram excluídos das análises todos os microRNAs que não amplificaram (não detectados) em pelo menos 50% das amostras por grupo. A amostra referência (calibrador) deste estudo foi elaborada com a mistura de cDNA pré-amplificado de cada amostra do grupo controle, formando-se, assim, um *pool* com 5 amostras. Os microRNAs que não amplificaram na amostra de referência também foram excluídos das análises. Como estratégia de normalização dos dados, utilizou-se o método de normalização global recomendado por Vandesompele e cols (2009). Resumidamente, nesta normalização os alvos expressos em todas as amostras são encontrados e então, usa-se a mediana dos Cts destes alvos como fator de normalização para calcular a quantificação relativa (RQ) baseada no método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Os microRNAs RNU44, RNU48, U6 não foram utilizados neste cálculo de normalização uma vez que não foram adotados como genes de referência (Vandesompele *et al.*, 2009).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	hsa-let-7a	hsa-let-7c	hsa-let-7d	hsa-let-7e	hsa-let-7f	hsa-let-7g	hsa-miR-1	hsa-miR-9	hsa-miR-10a	hsa-miR-10b	U6 snRNA	U6 snRNA	hsa-miR-15a	hsa-miR-15b	hsa-miR-16	hsa-miR-17	hsa-miR-18a	hsa-miR-18b	hsa-miR-19a	hsa-miR-19b	hsa-miR-20a	hsa-miR-20b	hsa-miR-21	hsa-miR-22
2	hsa-miR-23a	hsa-miR-23b	hsa-miR-24	hsa-miR-25	hsa-miR-26a	hsa-miR-26b	hsa-miR-27a	hsa-miR-27b	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-28	U6 snRNA	U6 snRNA	hsa-miR-29a	hsa-miR-29b	hsa-miR-29c	hsa-miR-30b	hsa-miR-30c	hsa-miR-31	hsa-miR-32	hsa-miR-33b	hsa-miR-34a	hsa-miR-34c	hsa-miR-92a	hsa-miR-93
3	hsa-miR-95	hsa-miR-96	hsa-miR-98	hsa-miR-99a	hsa-miR-99b	hsa-miR-100	hsa-miR-101	hsa-miR-103	hsa-miR-105	hsa-miR-106a	RNU44	hsa-miR-106b	hsa-miR-107	hsa-miR-122	hsa-miR-124a	hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-125b	hsa-miR-126	hsa-miR-127	hsa-miR-127-5p	hsa-miR-128a	hsa-miR-129-3p	hsa-miR-129
4	hsa-miR-130a	hsa-miR-130b	hsa-miR-132	hsa-miR-133a	hsa-miR-133b	hsa-miR-134	hsa-miR-135a	hsa-miR-135b	hsa-miR-136	hsa-miR-137	hsa-miR-138	hsa-miR-139-3p	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-141	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-143	hsa-miR-145	hsa-miR-146a	hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-146b	hsa-miR-147b
5	hsa-miR-148a	hsa-miR-148b	hsa-miR-149	hsa-miR-150	hsa-miR-152	hsa-miR-153	hsa-miR-154	hsa-miR-181a	hsa-miR-181c	hsa-miR-182	RNU48	hsa-miR-183	hsa-miR-184	hsa-miR-185	hsa-miR-186	hsa-miR-187	hsa-miR-188-3p	hsa-miR-190	hsa-miR-191	hsa-miR-192	hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-193b	hsa-miR-194
6	hsa-miR-195	hsa-miR-196b	hsa-miR-197	hsa-miR-198	hsa-miR-199a	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-199b	hsa-miR-200a	hsa-miR-200b	hsa-miR-200c	hsa-miR-202	hsa-miR-203	hsa-miR-204	hsa-miR-205	hsa-miR-208b	hsa-miR-210	hsa-miR-214	hsa-miR-215	hsa-miR-216a	hsa-miR-216b	hsa-miR-217	hsa-miR-218	hsa-miR-219	hsa-miR-221
7	hsa-miR-222	hsa-miR-223	hsa-miR-224	hsa-miR-296-3p	hsa-miR-296	hsa-miR-299-3p	hsa-miR-299-5p	hsa-miR-301	hsa-miR-301b	hsa-miR-302a	hsa-miR-302b	hsa-miR-302c	hsa-miR-320	hsa-miR-323-3p	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-326	hsa-miR-328	hsa-miR-329	hsa-miR-330	hsa-miR-330-5p	hsa-miR-331	hsa-miR-331-5p	hsa-miR-331-5p
8	hsa-miR-335	hsa-miR-337-5p	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-340	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-342-5p	hsa-miR-345	hsa-miR-361	hsa-miR-362-3p	hsa-miR-362	hsa-miR-363	hsa-miR-365	hsa-miR-367	hsa-miR-369-3p	hsa-miR-369-5p	hsa-miR-370	hsa-miR-371-3p	hsa-miR-372	hsa-miR-373	hsa-miR-374	hsa-miR-374	hsa-miR-374
9	hsa-miR-374-5p	hsa-miR-375	hsa-miR-376a	hsa-miR-376b	hsa-miR-377	hsa-miR-379	hsa-miR-380-3p	hsa-miR-381	hsa-miR-382	hsa-miR-383	hsa-miR-409-5p	hsa-miR-410	hsa-miR-411	hsa-miR-422a	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-424	hsa-miR-425-5p	hsa-miR-429	hsa-miR-431	hsa-miR-433	hsa-miR-449	hsa-miR-449b	hsa-miR-450a	hsa-miR-450b-3p
10	hsa-miR-450b-5p	hsa-miR-451	hsa-miR-452	hsa-miR-453	hsa-miR-454	hsa-miR-455-3p	hsa-miR-455	hsa-miR-483-5p	hsa-miR-484	hsa-miR-485-3p	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-486	hsa-miR-487a	hsa-miR-487b	hsa-miR-488	hsa-miR-489	hsa-miR-490	hsa-miR-491-3p	hsa-miR-491	hsa-miR-493	hsa-miR-494	hsa-miR-495	hsa-miR-496
11	hsa-miR-499-3p	hsa-miR-499	hsa-miR-500	hsa-miR-501-3p	hsa-miR-501	hsa-miR-502-3p	hsa-miR-502	hsa-miR-503	hsa-miR-504	hsa-miR-505	hsa-miR-507	hsa-miR-508	hsa-miR-508-5p	hsa-miR-509-5p	hsa-miR-510	hsa-miR-512-3p	hsa-miR-512-5p	hsa-miR-513-5p	hsa-miR-515-3p	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-516a-5p	hsa-miR-516b	hsa-miR-517a	hsa-miR-517c
12	hsa-miR-518a-3p	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-518b	hsa-miR-518c	hsa-miR-518d	hsa-miR-518d-5p	hsa-miR-518e	hsa-miR-518f	hsa-miR-519a	hsa-miR-519d	hsa-miR-519e	hsa-miR-520a	hsa-miR-520a#	hsa-miR-520d-5p	hsa-miR-520g	hsa-miR-521	hsa-miR-522	hsa-miR-523	hsa-miR-524-3p	hsa-miR-525-3p	hsa-miR-525	hsa-miR-526b	hsa-miR-532-3p	hsa-miR-532
13	hsa-miR-539	hsa-miR-541	hsa-miR-542-3p	hsa-miR-542-5p	hsa-miR-544	hsa-miR-545	hsa-miR-548a	hsa-miR-548a-5p	hsa-miR-548b	hsa-miR-548b-5p	hsa-miR-548c	hsa-miR-548c-5p	hsa-miR-548d	hsa-miR-548d-5p	hsa-miR-551b	hsa-miR-556-3p	hsa-miR-556-5p	hsa-miR-561	hsa-miR-570	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-576-3p	hsa-miR-576-5p	hsa-miR-579	hsa-miR-582-3p
14	hsa-miR-582-5p	hsa-miR-589	hsa-miR-590-5p	hsa-miR-597	hsa-miR-598	hsa-miR-615	hsa-miR-615-5p	hsa-miR-616	hsa-miR-618	hsa-miR-624	hsa-miR-625	hsa-miR-627	hsa-miR-628-5p	hsa-miR-629	hsa-miR-636	hsa-miR-642	hsa-miR-651	hsa-miR-652	hsa-miR-653	hsa-miR-654-3p	hsa-miR-654	hsa-miR-655	hsa-miR-660	hsa-miR-671-3p
15	hsa-miR-672	hsa-miR-674	hsa-miR-708	hsa-miR-744	hsa-miR-758	hsa-miR-871	hsa-miR-872	hsa-miR-873	hsa-miR-874	hsa-miR-875-3p	hsa-miR-876-3p	hsa-miR-876-5p	hsa-miR-885-3p	hsa-miR-885-5p	hsa-miR-886-3p	hsa-miR-886-5p	hsa-miR-887	hsa-miR-888	hsa-miR-889	hsa-miR-890	hsa-miR-891a	hsa-miR-891b	hsa-miR-892a	hsa-miR-892b
16	hsa-miR-208	hsa-miR-211	hsa-miR-212	hsa-miR-219-1-3p	hsa-miR-219-2-3p	hsa-miR-220	hsa-miR-220b	hsa-miR-220c	hsa-miR-298	hsa-miR-325	hsa-miR-346	hsa-miR-376c	hsa-miR-384	hsa-miR-412	hsa-miR-448	hsa-miR-492	hsa-miR-506	hsa-miR-509-3-5p	hsa-miR-511	hsa-miR-517b	hsa-miR-519c	hsa-miR-520b	hsa-miR-520e	hsa-miR-520f

Figura 1. MicroRNAs analisados no experimento TaqMan®Array Human MicroRNA Cards A.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	dme-miR-7	hsa-miR-548I	hsa-miR-30a-3p	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-30d	hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-34b	hsa-miR-126#	hsa-miR-154#	hsa-miR-182#	U6 snRNA	U6 snRNA	hsa-miR-206	hsa-miR-213	hsa-miR-302c#	hsa-miR-302d	hsa-miR-378	hsa-miR-380-5p	hsa-miR-1257	hsa-miR-200a#	hsa-miR-432	hsa-miR-432#	hsa-miR-497	hsa-miR-500
2	hsa-miR-1238	hsa-miR-488	hsa-miR-517#	hsa-miR-516-3p	hsa-miR-518c#	hsa-miR-519e#	hsa-miR-520h	hsa-miR-524	mmu-let-7d#	hsa-miR-363#	U6 snRNA	U6 snRNA	rno-miR-7#	hsa-miR-656	hsa-miR-549	hsa-miR-657	hsa-miR-658	hsa-miR-659	hsa-miR-551a	hsa-miR-552	hsa-miR-553	hsa-miR-554	hsa-miR-555	hsa-miR-557
3	hsa-miR-558	hsa-miR-559	hsa-miR-562	hsa-miR-563	hsa-miR-564	hsa-miR-566	hsa-miR-567	hsa-miR-569	hsa-miR-586	hsa-miR-587	RNU44	hsa-miR-588	hsa-miR-589	hsa-miR-550	hsa-miR-591	hsa-miR-592	hsa-miR-593	hsa-miR-596	hsa-miR-622	hsa-miR-599	hsa-miR-623	hsa-miR-600	hsa-miR-624	hsa-miR-601
4	hsa-miR-626	hsa-miR-629	hsa-miR-630	hsa-miR-631	hsa-miR-603	hsa-miR-604	hsa-miR-605	hsa-miR-606	hsa-miR-607	hsa-miR-608	hsa-miR-609	hsa-miR-633	hsa-miR-634	hsa-miR-635	hsa-miR-637	hsa-miR-638	hsa-miR-639	hsa-miR-640	hsa-miR-641	hsa-miR-613	hsa-miR-614	hsa-miR-616	hsa-miR-617	hsa-miR-643
5	hsa-miR-644	hsa-miR-645	hsa-miR-621	hsa-miR-646	hsa-miR-647	hsa-miR-648	hsa-miR-649	hsa-miR-650	hsa-miR-661	hsa-miR-662	RNU48	hsa-miR-571	hsa-miR-572	hsa-miR-573	hsa-miR-575	hsa-miR-578	hsa-miR-580	hsa-miR-581	hsa-miR-583	hsa-miR-584	hsa-miR-585	hsa-miR-29c#	hsa-miR-766	hsa-miR-595
6	hsa-miR-668	hsa-miR-767-5p	hsa-miR-767-3p	hsa-miR-454#	hsa-miR-769-5p	hsa-miR-770-5p	hsa-miR-769-3p	hsa-miR-802	hsa-miR-675	hsa-miR-505#	hsa-miR-218-1#	hsa-miR-221#	hsa-miR-222#	hsa-miR-223#	hsa-miR-136#	hsa-miR-34b	hsa-miR-185#	hsa-miR-186#	hsa-miR-195#	hsa-miR-30c-1#	hsa-miR-30c-2#	hsa-miR-32#	hsa-miR-31#	hsa-miR-130b#
7	hsa-miR-26a-2#	hsa-miR-361-3p	hsa-miR-let-7g#	hsa-miR-302b#	hsa-miR-302d#	hsa-miR-367#	hsa-miR-374a#	hsa-miR-23b#	hsa-miR-376a#	hsa-miR-377#	ath-miR159a	hsa-miR-30b#	hsa-miR-122#	hsa-miR-130a#	hsa-miR-132#	hsa-miR-148a#	hsa-miR-33a	hsa-miR-33a#	hsa-miR-92a-1#	hsa-miR-92a-2#	hsa-miR-93#	hsa-miR-96#	hsa-miR-99a#	hsa-miR-100#
8	hsa-miR-101#	hsa-miR-138-2#	hsa-miR-141#	hsa-miR-143#	hsa-miR-144#	hsa-miR-145#	hsa-miR-920	hsa-miR-921	hsa-miR-922	hsa-miR-924	hsa-miR-337-3p	hsa-miR-125b-2#	hsa-miR-135b#	hsa-miR-148b#	hsa-miR-146a#	hsa-miR-149#	hsa-miR-29b-1#	hsa-miR-29b-2#	hsa-miR-105#	hsa-miR-106a#	hsa-miR-16-2#	hsa-miR-let-7f#	hsa-miR-15b#	hsa-miR-27b#
9	hsa-miR-933	hsa-miR-934	hsa-miR-935	hsa-miR-936	hsa-miR-937	hsa-miR-938	hsa-miR-939	hsa-miR-941	hsa-miR-335#	hsa-miR-942	hsa-miR-943	hsa-miR-944	hsa-miR-99b#	hsa-miR-124#	hsa-miR-541#	hsa-miR-875-5p	hsa-miR-888#	hsa-miR-892b	hsa-miR-9#	hsa-miR-411#	hsa-miR-378	hsa-miR-151-3p	hsa-miR-340#	hsa-miR-190b
10	hsa-miR-545#	hsa-miR-183#	hsa-miR-192#	hsa-miR-200b#	hsa-miR-200c#	hsa-miR-155#	hsa-miR-10a#	hsa-miR-214#	hsa-miR-218-2#	hsa-miR-129#	hsa-miR-22#	hsa-miR-425#	hsa-miR-30d#	hsa-miR-7a#	hsa-miR-424#	hsa-miR-18b#	hsa-miR-20b#	hsa-miR-431#	hsa-miR-7-2#	hsa-miR-10b#	hsa-miR-34a#	hsa-miR-181a-2#	hsa-miR-744#	hsa-miR-452#
11	hsa-miR-409-3p	hsa-miR-181c#	hsa-miR-196a#	hsa-miR-483-3p	hsa-miR-708#	hsa-miR-92b#	hsa-miR-551b#	hsa-miR-202#	hsa-miR-193b#	hsa-miR-497#	hsa-miR-518e#	hsa-miR-543	hsa-miR-125b-1#	hsa-miR-194#	hsa-miR-106b#	hsa-miR-302a#	hsa-miR-519b-3p	hsa-miR-518#	hsa-miR-374b#	hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-let-7b#	hsa-miR-let-7c#	hsa-miR-let-7e#	hsa-miR-550
12	hsa-miR-593	hsa-miR-let-7f-1#	hsa-miR-let-7f-2#	hsa-miR-15a#	hsa-miR-16-1#	hsa-miR-17#	hsa-miR-18a#	hsa-miR-19a#	hsa-miR-19b-1#	hsa-miR-625#	hsa-miR-628-3p	hsa-miR-20a#	hsa-miR-21#	hsa-miR-23a#	hsa-miR-24-1#	hsa-miR-24-2#	hsa-miR-25#	hsa-miR-26a-1#	hsa-miR-26b#	hsa-miR-27a#	hsa-miR-29a#	hsa-miR-151-5P	hsa-miR-765	hsa-miR-338-5P
13	hsa-miR-620	hsa-miR-577	hsa-miR-144	hsa-miR-590-3P	hsa-miR-191#	hsa-miR-665	hsa-miR-520D-3P	hsa-miR-1224-3P	hsa-miR-1305	hsa-miR-513C	hsa-miR-513B	hsa-miR-1226#	hsa-miR-1236	hsa-miR-1228#	hsa-miR-1225-3P	hsa-miR-1233	hsa-miR-1227	hsa-miR-1286	hsa-miR-548M	hsa-miR-1179	hsa-miR-1178	hsa-miR-1205	hsa-miR-1271	hsa-miR-1201
14	hsa-miR-548J	hsa-miR-1263	hsa-miR-1294	hsa-miR-1269	hsa-miR-1265	hsa-miR-1244	hsa-miR-1303	hsa-miR-1259	hsa-miR-548P	hsa-miR-1264	hsa-miR-1255B	hsa-miR-1282	hsa-miR-1255A	hsa-miR-1270	hsa-miR-1197	hsa-miR-1324	hsa-miR-548H	hsa-miR-1254	hsa-miR-548K	hsa-miR-1251	hsa-miR-1285	hsa-miR-1245	hsa-miR-1292	hsa-miR-1301
15	hsa-miR-1200	hsa-miR-1182	hsa-miR-1288	hsa-miR-1291	hsa-miR-1275	hsa-miR-1183	hsa-miR-1184	hsa-miR-1276	hsa-miR-320B	hsa-miR-1272	hsa-miR-1180	hsa-miR-1256	hsa-miR-1278	hsa-miR-1262	hsa-miR-1243	hsa-miR-663B	hsa-miR-1252	hsa-miR-1298	hsa-miR-1290	hsa-miR-1249	hsa-miR-1248	hsa-miR-1289	hsa-miR-1204	hsa-miR-1826
16	hsa-miR-1304	hsa-miR-1203	hsa-miR-1206	hsa-miR-548G	hsa-miR-1208	hsa-miR-548E	hsa-miR-1274A	hsa-miR-1274B	hsa-miR-1267	hsa-miR-1250	hsa-miR-548N	hsa-miR-1283	hsa-miR-1247	hsa-miR-1253	hsa-miR-720	hsa-miR-1260	hsa-miR-664	hsa-miR-1302	hsa-miR-1300	hsa-miR-1284	hsa-miR-548L	hsa-miR-1293	hsa-miR-1825	hsa-miR-1296

Figura 2. MicroRNAs analisados no experimento de TaqMan®Array Human MicroRNA Cards B

Casuística

Considerando os restritivos critérios de elegibilidade, a dificuldade esperada em obter amostras satisfatórias e por se tratar de estudo inédito, sem dados prévios passíveis de estimar médias e desvios-padrão dos microRNAs avaliados, propusemos um tamanho amostral que permite identificar ou descartar uma grande diferença entre os grupos (Cohen, 1988).

Um n amostral de 5 pacientes por grupo (controle, endometrioses I/II e endometrioses III/IV) é suficiente para descartar uma diferença de 2,42 desvios-padrão (*large effect size*) com um poder de teste de 90% e alfa de 5% ou uma diferença de 2,09 desvios-padrão para um poder de teste de 80% e alfa de 5%. Essa análise de sensibilidade foi realizada no programa G Power considerando o teste de Mann Whitney.

3.11. Análise estatística

As variáveis (idade, IMC, tempo de infertilidade, número oócitos captados, número de oócitos maduros, número de oócitos injetados, número de oócitos fertilizados, taxa fertilização, número de embriões clivados, taxa de clivagem, número de embriões formados), foram representadas pela mediana e intervalo interquartil e apresentadas de modo descritivo.

A expressão dos microRNAs (valores de RQ) foi representada pela mediana e intervalo interquartil. Foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar a existência de diferença na expressão (valores de RQ) dos microRNAs analisados nos diferentes grupos (Controle, Endometriose I/II e endometriose III/IV). A hipótese nula testada foi de que as populações de cada grupo provem da mesma distribuição, ou seja, tem a mesma forma e dispersão. Quando a hipótese nula foi rejeitada foi utilizado o pós-teste de Dunn. Foi considerado significativo $p < 0,05$. Estes procedimentos foram implementados no programa R versão 3.2.2.

3.12. Análise de enriquecimento

A pesquisa de vias em que os genes regulados pelos microRNAs identificados como diferencialmente expressos entre os grupos foi realizada por meio da ferramenta DAVID, com base na *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Fluxograma do estudo

No período de fevereiro de 2013 a maio de 2014 foram analisados 651 prontuários de mulheres que participaram do Programa de Reprodução Assistida do Hospital Universitário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e foram submetidos à estimulação ovariana para ICSI. Destas pacientes 520 não atenderam os critérios de elegibilidade, sendo 30 exclusivamente por apresentarem idade superior a 40 anos e 490 por apresentarem outros fatores ou fatores associados (hipertensão arterial, uso de medicamentos, tabagista, uso de álcool, obesidade, outros fatores de infertilidade, infertilidade sem causa aparente, entre outros). Assim, as 131 elegíveis para participação no estudo foram entrevistadas, 47 pacientes não aceitaram participar da pesquisa e 84 assinaram o TCLE (Anexo 1), sendo 26 pacientes do grupo endometriose I/II, 34 pacientes do grupo endometriose III/IV e 24 pacientes do grupo controle. Das 84 pacientes, 30 não foram submetidas à captação de oócitos, sendo 2 por motivos financeiros (ausência de recursos financeiros para aquisição das medicações usadas para estimulação ovariana), 24 por ausência de resposta a estimulação ovariana, 3 pacientes por uso incorreto da medicação, 1 por exames alterados e outras 14 pacientes não entraram no estudo devido a diferentes protocolos de estimulação ovariana. Desta forma, obtivemos CCS doadas por 40 pacientes, sendo 11 pacientes com endometriose I/II, 16 pacientes com endometriose I/II e 13 pacientes controles. Destas, foram excluídas 25 pacientes sendo, 6 pacientes endometriose I/II, 11 pacientes endometriose III/IV e 8 pacientes controle, devido à baixa quantificação de RNA obtida. Sendo assim, foram analisadas CCs de 5 pacientes com endometriose I/II, 5 pacientes endometriose III/IV e 5 pacientes controles, que tiveram amostras adequadas para dar seguimento ao estudo (Figura 3).

Figura 3. Fluxograma do estudo.

4.2. Caracterização dos grupos

As pacientes do grupo controle foi composto por 5 pacientes sendo 3 pacientes com fator tubário bilateral e 2 pacientes com fator masculino. O grupo endometriose I/II foi composto por 3 pacientes com endometriose leve e 2 pacientes com endometriose mínima associada a fator masculino. O grupo de endometriose III/IV foi composto por 5 pacientes com endometriose sendo 2 pacientes com endometriose avançada e 3 pacientes com endometriose severa. Todas as pacientes do grupo endometriose III/IV não apresentavam imagem no US transvaginal subjetiva de endometrioma ovariano no ciclo que foram obtidas as células do cumulus.

Os dados clínicos das pacientes controle, endometriose I/II e endometriose III/IV estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização clínica, resposta à estimulação ovariana controlada e resultados de ICSI de pacientes inférteis controles, com endometriose pélvica I/II e endometriose III/IV.

Variável	Controle	Endometriose	Endometriose
		I/ II	III/ IV
Idade (anos)	29 (28 ;33)	37 (35;38)	34 (28;35)
IMC	22,01 (20,98;27,18)	23,73 (22,58;26,89)	24 (23,5;26,33)
Tempo de infertilidade (meses)	78 (48;89)	96 (72;188)	54 (48 ;89)
Número oócitos captados	11 (10 ; 12)	4 (4;6)	8 (5;8)
Número de oócitos maduros	8 (6; 9)	4 (3 ;4)	7 (5;7)
Número de oócitos injetados	8 (6;9)	4 (3;4)	7 (5;7)
Número de oócitos fertilizados	7 (5;8)	4 (3;4)	5 (3; 6)
Taxa fertilização	88 (87,50 ; 90)	100 (100;100)	85,71 (71,42;100)
Número de embriões clivados	5 (4 ;6)	4 (2 ;4)	4 (3 ; 4)
Taxa de clivagem (%)	100 (85,71;100)	100 (89;100)	80 (66,67; 100)
Número de embriões formados	2 (2;3)	2 (2;4)	4 (2; 4)
Número de embriões transferidos	2 (2;2)	2 (2;2)	2 (0; 2)

Nota. Dados apresentados como mediana (intervalo interquartil).

1. Resultados referentes ao objetivo 1: Comparar a expressão de 754 microRNAs em células do Cumulus (CCs) entre mulheres inférteis controles (fatores masculino e/ou tubário de infertilidade), endometriose pélvica estágios I/II e estágios III/IV submetidas à estimulação ovariana para a realização de técnicas de Reprodução Assistida (RA) de alta complexidade

Dos 754 microRNAs alvos analisados no PCR em tempo real, 350 miRNAs foram excluídos por não amplificarem em 50% das amostras por grupo e 1 microRNA por não apresentar amplificação na amostra de referência. Desta forma, analisamos a quantificação relativa (RQ) de um total de 404 microRNAs (Anexo 3).

Após a análise do perfil de expressão dos 404 microRNAs em CCs de pacientes inférteis controles e com endometriose I/II e III/IV por *TaqMan Array cards*, 09 microRNAs apresentaram uma diferença significativa de expressão (Tabela 2).

Ao comparar-se endometriose I/II e controle, os microRNAs hsa-let-7f-1#, hsa-miR-1291, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-218, hsa-miR-30b e hsa-miR-629-5p foram menos expressos nas pacientes com endometriose I/II em relação as pacientes controles.

Ao comparar-se endometriose III/IV e controle, os microRNAs hsa-miR-1291, hsa-miR-187-3p, hsa-miR-30b, hsa-miR-532-3p e hsa-miR-629-5p foram menos expressos nas pacientes com endometriose III/IV em relação as pacientes controles.

Os microRNAs, hsa-miR-1291, hsa-miR-30b e hsa-miR-629-5p foram menos expressos tanto no grupo endometriose I/II como no grupo endometriose III/IV quando comparados ao grupo controle.

Ao comparar-se os grupos endometriose I/II e endometriose III/IV entre si, os microRNAs hsa-miR-187-3p e hsa-miR-532-3p foram menos expressos nas pacientes com endometriose III/IV. Por outro lado, os microRNAs hsa-let-7f-1# e hsa-miR-362-3p foram mais expressos nas pacientes com endometriose III/IV quando comparadas às pacientes com endometriose I/II.

Tabela 2. Perfil diferencial de microRNAs expressos em células do cumulus de mulheres inférteis sem endometriose e com endometriose estágios I/II e III/IV.

MicroRNA	Controle Mediana (IIQ)	Endometriose I/II Mediana (IIQ)	Endometriose III/IV Mediana (IIQ)	Expressão diferencial (C x EI/II)	Expressão diferencial (C x EIII/IV)	Expressão diferencial (EI/II x EIII/IV)
hsa-let-7f-1#	3.37 (1.51;4.22)	1.08 (0.26 ; 1.18)	4.78 (3.09;-7.94)	<i>down</i>	...	<i>up</i>
hsa-miR-1291	0.91 (0.32 ; 1.19)	0.06 (0.03 ; 0.09)	0.13 (0.09 ;0.23)	<i>down</i>	<i>down</i>	...
hsa-miR-140-5p	1.03 (0.88 ; 1.38)	0.61 (0.55 ;0.77)	0.71 (0.61;0.89)	<i>down</i>	...	...
hsa-miR-187-3p	2.32 (1.02 ; 6.73)	2.59 (1.27 ;3.83)	0.10 (0.05 ; 0.55)	...	<i>down</i>	<i>down</i>
hsa-miR-218	0.25 (0.21 ;0.75)	0.16 (0.14 ;0.16)	0.17 (0.15 ; 0.30)	<i>down</i>	...	...
hsa-miR-30b	0.56 (0.55;0.82)	0.49 (0.19 ; 0.49)	0.24 (0.18 ; 0.27)	<i>down</i>	<i>down</i>	...
hsa-miR-362-3p	1.97 (1.00 ; 2.31)	0.53 (0.23 ;1.26)	4.06 (2.79 ;6.91)	...	...	<i>up</i>
hsa-miR-532-3p	1.27 (1.25 ; 1.85)	1.16 (1.14 ; 1.48)	0.11 (0.02 ;0.34)	...	<i>down</i>	<i>down</i>
hsa-miR-629-5p	1.95 (1.56 ; 3.04)	0.79 (0.36 ; 1.12)	0.52 (0.47;1.07)	<i>down</i>	<i>down</i>	...

Nota. C: controle. EI/II: endometriose estágios I/II. EIII/IV: endometriose estágios III/IV. Os valores estão expressos em Mediana (intervalo interquartil - IIQ). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Utilizado o pós-teste de Dunn.

2. *Realizar uma análise in silico para enriquecimento das vias dos genes regulados pelos miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos e destacar as vias relacionadas à aquisição de competência oocitária possivelmente alteradas nas pacientes com a doença*

4.2.1. Controle versus endometriose estágios I/II:

Os microRNAs hsa-let-7f-1#, hsa-miR-1291, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-218 hsa-miR-30b e hsa-miR-629-5p regulam um total de 2048 genes validados. Destes, 1558 não se encontram em vias descritas e 490 genes participam de 57 diferentes vias do KEGG. Dez vias foram consideradas de interesse para este estudo por terem possível papel na função das CCs e na aquisição de competência oocitária (Tabela 3).

Tabela 3. Vias gênicas relacionadas a comparação controle versus endometriose estágios I/II reguladas pelos microRNAs desregulados (hsa-lef-7f-1#, hsa-miR-1291, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-218 hsa-miR-30b e hsa-miR-629-5p).

Via	Genes envolvidos
Via de sinalização p53	<i>ATM,ATR, MDM2, MDM4, PERP, CASP3, CCNB2, CCND1,CCND, CCNE2, CCNG1, CDK6, CDKN1A</i>
Via de sinalização Wnt	<i>APC, CREBBP, CXXC4, EP300,WNT5A,ROCK2, VANGL2, WNT7B, AXIN1, CSNK1E, CHD8, CCND1, CCND3, DKK2, DVL3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD9, GSK3B, GPC4, LEF1, MAPK8, NFATC3, PPAR, PRICKLE1, PRICKLE1, PRKCA, PPP3CB, RHOA, SOST, SFRP2, TP53, MYC</i>
Via de sinalização Ras	<i>ABL1, BCL2L1, BRAP, ETS2, GNB1, GNB4, GNG5, GAB1, GAB2, MET, RAPIB, RASGRP3 ,RALA, RASA4, SHC1, ANGPT4, CALM1,CSF1, .EFNA1, EGFR, FGF2, FGF9, IKBKB, IGF1R, IGF1, KSR1, KSR2, MAPK8, NRAS, PAK2, PLCE1, PLCG2, PDGFRA, PDGFRB, PDGFB,PRKCA, PRKCA, RHOA, STK4, SYNGAP1, VEGFA, VEGFC</i>
Junções aderentes	<i>CREBBP ,EP300, MET,WASL, ACTB, ACTN1, CTNNA1, CTNND1, EGFR, IGF1R, LEF1, PARD3 ,PTPRB, RHOA, SNAI1, SNAI2, TGFBRI, VCL</i>
Via de sinalização PI3K-Akt	<i>BCL2L1, BCL2L11 ,BCL2, GNB1, GNB4, GNG4, GNG5, JAK1, MDM2, MET, ANGPT4, CREB1, CREB3L1, COL4A1, COL5A1, COL5A1, CSF1, CCND1, CCND3, CCNE2, CDK6, CDKN1A, CDKN1B, EFNA1, EGFR, FGF2, FGF9, FN1, FOXO3, GSK3B, HSP90B1 ,IKBKB, IGF1R, IGF1, ITGA3, ITGAV, ITGB1, ITGB3, IFNAR2, LAMB3, LAMC1, MTOR, NRAS, PDGFRA, PDGFRB, PDGFB, PDGFB, PRLR, PRKCA, PPP2CB, PPP2R5E, PPP2R2A, THBS1, TP53,YWHAB, YWHAQ, YWHAZ, MYC, VEGFA</i>

Via	Genes envolvidos
Via de sinalização Rap1	<i>CRKL, GNAI2, GNAS, MET, RAP1B, RASGRP3, RALA, ACTB, ANGPT4, CALM1, CTNND1, CSF1, EFNA1, EGFR, FGF2, FGF9, FPR1, IGF1R, IGF1, ITGB1, ITGB3, MAP2K3, NRAS, PARD3, PLCE1, PDGFRA, PDGFRB, PDGFB, PFN2, PRKCA, RHOA, SIPA1L2, SIPA1L2, TLN1, THBS1, VEGFA, VEGFC</i>
Via de sinalização FoxO	<i>APC, CRKL, GNAI2, GNAI3, ROCK2, WASL, ABI2, ACTB, ARPC1B, ARPC3, ACTN1, EGFR, FGF2, FGF9, FN1, ITGA3, ITGAV, ITGB1, ITGB3, NRAS, PAK2, RAC1, PIP4K2A, PIP4K2B, PDGFRA, PDGFRB, PDGFB, PFN2, PPP1CC, PPP1R12A, PPP1R12B, RDX, RHOA, SSH1, VAV2, VCL</i>
Via de sinalização ErbB	<i>ABL1, CRKL, CBL, GAB1, SHC1, CDKN1A, CDKN1B, EGF, GSK3B, MTOR, MAPK8, MAP2K7, NRAS, PAK2, PLCG2, PRKCA, TGFA, MYC</i>
Via de sinalização MAPK	<i>PFKFB3, ELAVL1, RAB10, STRADB, ACACA, ADIPOR2, ADIPOQ, CREB1, CREB3L1, CCND1, FOXO3, HNF4A, IGF1R, IGF1, MTOR, PPARG, PRKAG1, PPP2CB, PPP2R5E, PPP2R2A, PPP2R1B, SCD5.</i>
Metabolismo de ácidos graxos	<i>ELOVL5, ELOVL6, ACAA2, ACACA, ACADL, EHHADH, FADS1, FADS2, HSD17B12, MECR, SCD5</i>

4.2.2. Controle versus endometriose estágios III/IV

Os microRNAs hsa-miR-1291, hsa-miR-187-3p, hsa-miR-30b, hsa-miR-532-3p e hsa-miR-629-5p regulam um total de 1134 genes validados e, destes, 989 não foram descritos em nenhuma via, sendo que 145 genes foram enriquecidos em 17 diferentes vias do KEGG. Destas, 5 vias são de interesse para o estudo pelo seu possível papel na função das CCs e na aquisição de competência oocitária. (Tabela 4).

Tabela 4: Vias gênicas relacionadas a comparação controle versus endometriose estágios III/IV reguladas pelos microRNAs desregulados (hsa-miR-1291, hsa-miR-187-3p, hsa-miR-30b, hsa-miR-532-3p e hsa-miR-629-5p).

Via	Genes envolvidos
Apoptose	<i>ATM, BCL2, CFLAR, DFFA, TNFRSF10B, TNFRSF10D, XIAP, CASP3, CYCS, TNF e TP53</i>
Via de sinalização p53	<i>ATM, PERP, CASP3, CCNE2, CDK2, CYCS, IGF1, PPM1D, RRM2, SERPINE1 e TP53</i>
Via de sinalização Rap1	<i>CRKL, GNAI2, GNAS, RAP1B, RASGRP3, RAPGEF6, ANGPT4, CTNNB1, CTNND1, CSF1, GRIN2B, IGF1, ITGB3, PARD3, PLCE1, PDGFRA, PDGFRB, SIPA1 e TLN1</i>
Via de sinalização Wnt	<i>CXXC4, ROCK2, VANGL2, WNT7B, CAMK2G, CSNK1E, CTNNB1, FRAT2, GPC4, MAPK8, PRICKLE1, PPP3CB, PPP3R1, PPP3R2, TP53</i>
Metabolismo de ácidos graxos	<i>ELOVL5, ACAA2, ACADL, ACSL6, EHHADH, HSD17B12, SCD5</i>

4.2.3. Micros comuns das comparações controle versus endometriose estágios I/II e controle versus endometriose estágios III/IV

Os microRNAs hsa-miR-1291, hsa-miR-30b e hsa-miR-629-5p são comuns nas comparações controle $\times$ endometriose I/II e controle $\times$ endometriose III/IV, sendo menos expressos tanto na doença inicial como na avançada. Esses microRNAs regulam 934 genes e, destes, 78 genes são enriquecidos em 8 diferentes vias do KEGG, sendo 3 vias focos de interesse deste estudo (Tabela 5).

Tabela 5: Vias gênicas relacionadas a comparação controle versus endometriose estágios I/II e controle versus endometriose estágios III/IV reguladas pelos microRNAs desregulados (hsa-miR-1291, hsa-miR-30b e hsa-miR-629-5p).

Via	Genes envolvidos
Apoptose	<i>ATM, BCL2, CFLAR, DFFA, TNFRSF10B, TNFRSF10D, XIAP, CASP3, TP53</i>
Via de sinalização p53	<i>ATM, PERP, CASP3, CCNE2, IGF1, PPM1D, RRM2, SE RPINE1, TP53</i>
Metabolismo de ácidos graxos	<i>ELOVL5, ACAA2, ACADL, EHHADH, HSD17B12, SC D5</i>

4.2.4. Endometriose estágios I/II versus endometriose estágios III/IV

Ao comparar-se os grupos endometriose I/II e endometriose III/IV entre si, os microRNAs hsa-let-7f-1# e hsa-miR-362-3p apresentaram-se mais expressos e os microRNAs hsa-miR-187-3p e hsa-miR-532-3p menos expressos na doença avançada. Analisando os genes regulados pelos microRNAs identificados, 18 genes foram comuns a micros mais e menos expressos, de modo que foram excluídos da análise.

Os microRNAs hsa-let-7f-1# e hsa-miR-362-3p, estão mais expressos na endometriose III/IV, regulam 916 genes e, destes, 152 genes foram enriquecidos em 37 diferentes vias do KEGG. Destas, 4 vias são de interesse para o estudo (Tabela 6) por seu possível papel na função das CCs e desenvolvimento oocitário.

Tabela 6. Vias gênicas dos genes de interesse relacionadas a comparação endometriose estágios I/II versus endometriose estágios III/IV relacionados aos microRNAs (let-7f-1# e hsa-miR-362-3p).

Via	Genes envolvidos
Via de sinalização Jak-STAT	<i>MPL, CCND1, IFNLR1, IL13, IL5RA, IL6ST, PIK3CG, PIK3R1, PIAS1, STAT2, STAM, SOCS1, SOCS3, SOCS7, MYC</i>
Via de sinalização FoxO	<i>FASLG, MDM2, SMAD2, ATG12, CCNB2, CCND1, CDKN1A, CDKN1B, IGF1R, IRS1, PIK3CG, PIK3R1, SOD2, TGFBR1</i>
Via de sinalização Wnt	<i>BAMBI, VANGL1, WNT7A, WNT9A, CCND1, DAAM2, DVL3, FZD2, FZD4, FZD5, FZD9, GSK3B, GPC4, MYC</i>
Via de sinalização ErbB	<i>CRK, CDKN1A, CDKN1B, GSK3B, MAP2K7, PAK6, PIK3CG, PIK3R1, PLCG2, MYC</i>

Por outro lado, os microRNAs hsa-miR-187-3p e hsa-miR-532-3p, que estão menos expressos na endometriose III/IV, regulam 203 genes e estes não se encontram descritos em vias.

Na tabela 7, encontram-se descritas todas as vias relacionadas aos microRNAs que foram significativos para este estudo.

Tabela 7. Descrição das vias metabólicas relacionadas aos genes-alvo dos microRNAs (miRNAs)

Vias	Descrição
Via de sinalização p53	A proteína p53 é um ativador transcricional, resultando em parada do ciclo celular, senescência celular ou apoptose. A ativação desta via é induzida por uma série de sinais, incluindo danos ao DNA, estresse oxidativo e ativação de oncogenes
Via de sinalização Wnt	Esta via está relacionada a processos de desenvolvimento básicos como destino celular, proliferação e controle da divisão celular assimétrica embrionária e consiste em uma cascata de sinalização celular. Existem três vias Wnt diferentes: a via canônica, a via de polaridade celular planar e a via Wnt/Ca ²⁺ . A via canônica está associada à estabilização do citoesqueleto e proliferação celular, enquanto a via de polaridade está relacionada à adesão celular, ao controle da migração e da orientação celulares e a via do cálcio está relacionada ao aumento do Ca ²⁺ livre intracelular e ativação de quinases
Via de sinalização Ras	As proteínas Ras são GTPases que funcionam como comutadores moleculares para vias de sinalização que regulam a proliferação celular, sobrevivência, crescimento, migração, diferenciação celular. Tem relação com a via PI3K-Akt.
Junções aderentes	As junções aderentes são importantes para manter a arquitetura do tecido e a polaridade celular e podem limitar o movimento celular e a proliferação. As alterações no estado de fosforilação da beta-catenina afetam a adesão célula-célula, a migração celular e o nível de sinalização da beta-catenina. Possui relação com a via Wnt.
Via de sinalização PI3K-Akt	É ativada por muitos tipos de estímulos celulares ou insultos tóxicos e regula funções celulares fundamentais tais como transcrição, tradução, proliferação, crescimento e sobrevivência
Via de sinalização Rap1	Rap1 é uma pequena GTPase que controla diversos processos, tais como adesão celular, formação de junção célula-célula e polaridade celular.

Vias	Descrição
Via de sinalização FoxO	Regula a expressão de genes em eventos fisiológicos celulares incluindo apoptose, controle do ciclo celular, metabolismo da glicose, resistência ao stress oxidativo e longevidade. .
Via de sinalização ErbB	Está relacionada a fatores de crescimento extracelular e a vias de sinalização intracelular que regulam diversas respostas biológicas, incluindo proliferação, diferenciação, motilidade celular e sobrevivência.
Via de sinalização MAPK	O sistema MAPK atua como um sensor de status de energia celular. Esta cascata de ativação está envolvida em diversas funções celulares, incluindo proliferação, diferenciação e migração celular.
Metabolismo de ácidos graxos	N/D
Apoptose	É um processo geneticamente programado para a eliminação de células danificadas ou redundantes por ativação de caspases (cisteína-proteases específicas de aspartato).
Via de sinalização Jak-STAT	É uma via de ativação de uma cascata transcricional de sinais envolvidos no desenvolvimento e homeostase. Em mamíferos, esta via é o principal mecanismo de sinalização para uma ampla gama de citocinas e fatores de crescimento. Relacionada a outras vias como MAPK, P13kK e Ras.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A endometriose é uma doença frequentemente associada à infertilidade, sendo altamente prevalente entre mulheres inférteis (D'hooghe *et al.*, 2003; Holoch e Lessey, 2010). Apesar de os mecanismos de causa e efeito dessa relação ainda carecerem de esclarecimentos, diversos estudos propõem um impacto deletério da endometriose sobre a qualidade oocitária (Brizek *et al.*, 1995; Saito *et al.*, 2002; Allegra *et al.*, 2014; Barcelos *et al.*, 2009, 2015; Da Broi *et al.*, 2014; Donabela *et al.*, 2015; Da Luz *et al.*, 2017). A aquisição da competência oocitária é condicionada pelo conteúdo do fluido folicular e a influência das células da granulosa e do cumulus (Canipari, 2000; Thomas *et al.*, 2005; Thomas e Vanderhyden, 2006; Gilchrist, 2011). Para que ocorra um desenvolvimento folicular e oocitário adequados, levando à ovulação, é necessário que ocorra uma comunicação precisa entre as células do cumulus e entre elas e o oócito, por meio de várias moléculas codificadas por genes específicos (Albertini *et al.*, 2003; Assou *et al.*, 2006), cuja expressão é regulada a nível de transcrição e tradução. Os microRNAs atuam como reguladores pós-transcricionais (Ambros *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2006), e alguns estudos evidenciaram que a desregulação de microRNAs pode levar a comprometimento da qualidade gamética (Chen *et al.*, 2017; Machtinger *et al.*, 2017). Desta forma, propusemos um estudo inédito da análise de microRNAs em CCs de mulheres inférteis com e sem endometriose com o objetivo de avaliar se ocorre desregulação de microRNAs envolvidos na regulação de processos biológicos e vias de atuação importantes para a aquisição e manutenção da qualidade oocitária, visando obter mais informações sobre os mecanismos pelos quais a endometriose poderia interferir com a qualidade oocitária. Considerando o restrito acesso populacional às técnicas de reprodução assistida, mesmo em países desenvolvidos, compreender esses mecanismos etiopatogênicos pode ser valioso na concepção de abordagens terapêuticas efetivas para melhorar a fecundidade natural desses pacientes.

Ao compararmos os grupos controle e endometriose I/II, encontramos os microRNAs hsa-let-7f-1#, hsa-miR-1291, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-218, hsa-miR-30b e hsa-miR-629-5p menos expressos nas pacientes com a doença. Os genes regulados por esses microRNAs estão envolvidos em vias relacionadas, na sua maioria, a processos de controle do ciclo celular, proliferação celular e apoptose (via de sinalização p53, via de sinalização Wnt, via de sinalização Ras, junções aderentes, via de sinalização PI3K-Akt, via de sinalização Rap1, via de sinalização FoxO, via de sinalização ErbB, via de sinalização MAPK e metabolismo de ácidos graxos). Como os miRNAs atuam como silenciadores de expressão (Singh *et al.*, 2008) acreditamos que haja uma maior expressão dessas vias na doença inicial.

A via de sinalização p53 está envolvida com processos de reparo de danos ao DNA, regulação do ciclo celular e indução de apoptose. A ativação do p53 é induzida por uma série de sinais como o estresse oxidativo (Pietenpol *et al.*, 2002). A via de sinalização FoxO também está envolvida no controle do ciclo celular, apoptose, resistência ao estresse oxidativo e longevidade (Hagenbuchner *et al.*, 2013). Da mesma forma, a via de sinalização PI3K-Akt está relacionada a processos como controle do ciclo celular e apoptose. A via de sinalização Ras também atua na parada do ciclo celular e apoptose, tendo a função de regular a proliferação e sobrevivência celular (Cox *et al.*, 2003). Uma maior ativação tanto da via p53 como das vias FoxO, PI3K-Akt e Ras pode indicar que as CCs estejam sofrendo um dano oxidativo, com tentativa de reparo ao DNA e indução de apoptose, o que pode comprometer o desenvolvimento folicular e afetar a maturação e a qualidade oocitárias. Esses achados corroboram evidências da literatura de alterações no ciclo celular e maior apoptose em CCs dessas pacientes (Toya *et al.*, 2000 e Díaz *et al.*, 2009). Além disso, a endometriose é uma doença que tem sido associada ao estresse oxidativo (Choi, *et al.*, 2015; Da Broi *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2013; Nasiri *et al.*, 2017; Prieto *et al.* 2012; Singh *et al.*, 2013) com alterações em marcadores tanto a nível peritoneal (Polak *et al.*, 2013; Santulli *et al.*, 2015; Shanti *et al.*, 1999), como sistêmico (Andrade *et al.*, 2010; Da Broi *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2013; Nasiri *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2013) e folicular (Choi, *et al.*, 2015; Donabela *et al.*, 2015; Da Broi *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2013), havendo evidência de dano oxidativo ao DNA no microambiente folicular dessas mulheres (Da Broi *et al.*, 2016). Sabe-se que as CCs atuam na proteção do oócito contra agentes pro-oxidantes (Devine *et al.*, 2012). No entanto, quando essa capacidade antioxidante é exacerbada, elas podem ser danificadas e os oócitos sofrem os efeitos nocivos do estresse oxidativo (Shaeib *et al.*, 2016). Assim, acreditamos que o estresse oxidativo possa estar envolvido no comprometimento da CCs e, conseqüentemente, da qualidade oocitária dessas pacientes, o que poderia estar envolvido na infertilidade apresentada por elas.

As vias de sinalização Wnt, junções aderentes, Rap1 e ErbB estão envolvidas no controle da polaridade, adesão e proliferação celular (Saito *et al.*, 2001; Nakanishi *et al.*, 2004; Hattori *et al.*, 2003; Yarden Y, Sliwkowski *et al.*, 2001). A alteração dessas vias em CCs de mulheres inférteis com endometriose sugere uma inibição do processo de proliferação celular, o que, juntamente com a ativação de vias relacionadas à indução da apoptose, indica dano às CCs, com possível comprometimento do desenvolvimento oocitário.

Já o sistema MAPK atua como um sensor de status de energia celular. É ativado por aumentos na relação AMP:ATP celular causada por estresses metabólicos que interferem com

a produção de ATP ou que aceleram o consumo de ATP. Uma vez ativada, a MAPK conduz a uma inibição concomitante de vias biossintéticas que consomem energia, tais como síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio e ativação de vias catabólicas produtoras de ATP, tais como oxidação de ácidos graxos e glicólise (Hardie *et al.*, 2004). A via de metabolismo de ácidos graxos tem relação direta com a via MAPK e está envolvida nos processos de fosforilação oxidativa e cadeia respiratória. Esses processos são extremamente importantes para a célula. A fosforilação oxidativa, tem por função produzir energia na forma de ATP através da oxidação de nutrientes e liberação de elétrons (Weber e Senior, 2003; Dumesic *et al.*, 2015 Weber e Senior, 2003; Dumesic *et al.*, 2015). Esse mecanismo molecular de formação de ATP ocorre por meio dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial localizada na membrana interna da mitocôndria e também contribui para a geração de espécies reativas de oxigênio (Weber e Senior, 2013; Dumesic *et al.*, 2015). Os ácidos graxos são considerados importantes fontes de energia para o oócito (Sanchez-Lazo *et al.*, 2014). As células do cumulus são capazes de incorporar e armazenar os ácidos graxos formando gotículas lipídicas (LDs), protegendo assim o oócito dos níveis elevados de ácidos graxos saturados (Sanchez-Lazo *et al.*, 2014). Assim, a maior expressão dessas vias em CCs pode indicar uma maior necessidade de aporte energético frente ao estresse oxidativo folicular já evidenciado na doença, com consequente aumento da oxidação de ácidos graxos e glicólise, culminando com maior produção de ATP e também maior geração de espécies reativas, o que pode danificar mais ainda as CCs e comprometer a aquisição de competência oocitária. Nesse sentido, Hsu *et al.*, 2015 evidenciou atividade mitocondrial comprometida em CCs de mulheres inférteis com endometriose, o que pode reforçar nossos achados.

Quando comparamos os grupos controle e endometriose III/IV encontramos os microRNAs hsa-miR-1291, hsa-miR-187-3p, hsa-miR-30b, hsa-miR-532-3p e hsa-miR-629-5p menos expressos nas pacientes com endometriose III/IV em relação às pacientes controles. Os genes regulados por estes microRNAs estão envolvidos em vias semelhantes à comparação endometriose I/II e controle, envolvidas, na sua maioria, em processos de apoptose, regulação do ciclo e proliferação celular (via de apoptose, via de sinalização p53, via de sinalização Rap1, Via de sinalização Wnt e metabolismo de ácidos graxos). Sendo assim, esse grupo de mulheres também apresentaram maior atividade na via de apoptose, cuja ativação pode se dar por danos ao DNA e estresse metabólico. Esses achados sugerem que, na doença, essas vias também estão mais ativas, decorrentes dos danos ao DNA promovidos pelo estresse oxidativo, com consequente indução de apoptose, redução de proliferação, aumento de adesão celular, maior

necessidade energética e maior produção de EROs nessas células. Nesse contexto, um estudo que avaliou a expressão de genes codificantes de antioxidantes enzimáticos em CCs de mulheres com endometriose evidenciou maior expressão do gene *SOD1* em CC de pacientes inférteis com endometriose III/IV quando comparadas a pacientes inférteis sem endometriose e com endometriose I/II, sugerindo uma resposta antioxidante compensatória frente ao dano oxidativo oocitário desencadeado pela doença (Donabela *et al.*, 2015).

Ao comparar-se os grupos endometriose I/II e endometriose III/IV, os microRNAs hsa-let-7f-1# e hsa-miR-362-3p estavam mais expressos e os microRNAs hsa-miR-187-3p e hsa-miR-532-3p apresentaram-se menos expressos nas pacientes com endometriose III/IV. Analisando os genes regulados pelos microRNAs desregulados, 18 genes eram comuns a micros mais e menos expressos, de modo que foram excluídos da análise. Os genes relacionados aos microRNAs mais expressos estão envolvidos com as vias de sinalização JAK-Stat, via de sinalização FoxO, via de sinalização Wnt e via de sinalização ErbB. A via de sinalização do Jak-Stat está envolvida com interação de receptor de citocina, ciclo celular e anti-apoptose. Como descrito anteriormente, a via de sinalização FoxO tem relação com estresse oxidativo, reparo de DNA e apoptose. E as vias de sinalização Wnt e ErbB estão envolvidas no controle da polaridade, adesão e proliferação celular. A menor atividade dessas vias em mulheres inférteis com endometriose avançada indicam menor reparo de dano de DNA, mais apoptose e menos proliferação celular nas CCs dessas pacientes, sugerindo maior dano folicular e, consequentemente, oocitário com a progressão da doença. Os genes regulados pelos micros menos expressos na endometriose I/II comparada à III/IV não estão envolvidos em vias comuns, sendo necessária a realização de mais estudos a fim de se verificar as funções biológicas em que cada um desses genes está envolvido e, assim, entender melhor seu papel na qualidade oocitária diante da doença inicial.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os microRNAs hsa-let-7f-1#, hsa-miR-1291, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-218, hsa-miR-30b e hsa-miR-629-5p apresentam-se menos expressos nas CCs das pacientes inférteis com endometriose I/II em relação às pacientes controles.

Os microRNAs hsa-miR-1291, hsa-miR-187-3p, hsa-miR-30b, hsa-miR-532-3p e hsa-miR-629-5p apresentam-se menos expressos nas CCs das pacientes com endometriose III/IV em relação às pacientes controles.

Os microRNAs hsa-miR-1291, hsa-miR-30b e hsa-miR-629-5p apresentam-se menos expressos nas CCs tanto do grupo endometriose I/II, como do grupo endometriose III/IV, quando comparados ao grupo controle.

Os microRNAs hsa-miR-187-3p e hsa-miR-532-3p apresentam-se menos expressos e os microRNAs hsa-let-7f-1# e hsa-miR-362-3p mais expressos nas CCs das pacientes com endometriose III/IV em relação às pacientes com endometriose I/II.

A análise de enriquecimento das vias reguladas por esses micros sugere alterações em vias de apoptose, dano oxidativo ao DNA e proliferação nas CCs de mulheres inférteis tanto com endometriose inicial como avançada o que poderia estar envolvido na etiopatogênese da infertilidade associada à doença. Dessa forma, nossos achados evidenciam desregulação em microRNAs em células do cumulus de mulheres inférteis com endometriose inicial e avançada passíveis de comprometer vias envolvidas na aquisição da competência oocitária, auxiliando a elucidar mecanismos moleculares envolvidos no comprometimento da qualidade oocitária relacionado à doença.

Referências Bibliográficas

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu LG, Romão GS, Dos Reis RM, Ferriani RA, De Sá MF, De Moura MD. Reduced aromatase activity in granulosa cells of women with endometriosis undergoing assisted reproduction techniques. 2006 Aug;22(8):432-6.
- Albertini DF, Barrett SL. Oocyte-somatic cell communication. *Reproduction*. 2003 61:49-54. 2003.
- Al-Fadhli R, Kelly SM, Tulandi T, Tanr SL. Effects of different stages of endometriosis on the outcome of in vitro fertilization. *J Obstet Gynaecol Can* 2006; 28:888-91.
- ALPHA Scientists In Reproductive Medicine; ESHRE Special Interest Group Embryology. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online*. 2011 Jun;22(6):632-46. doi: 10.1016/j.rbmo.2011.02.001. Epub 2011 Apr 11.
- Altmäe S MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity., Martinez-Conejero JA, Esteban FJ, Ruiz-Alonso M, Stavreus-Evers A, Horcajadas JA, Salumets A. *Reprod Sci*. 2013 Mar;20(3):308-17. doi: 10.1177/1933719112453507. Epub 2012 Aug 17.
- Andrade, A. Z. et al. [Serum markers of oxidative stress in infertile women with endometriosis]. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 32, n. 6, p. 279-85, Jun 2010. ISSN 1806-9339.
- Assou S, Anahory T, Pantesco V, Carroul T, Pellestor F, Klein B, et al. The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Human reproduction*. 2006; 21:15.
- Barbosa MA, Teixeira DM, Navarro PA, Ferriani RA, Nastri CO, Martins WP. Impact of endometriosis and its staging on assisted reproduction outcome: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014 Sep;44(3):261-78.
- Barcelos ID, Vieira RC, Ferreira EM, Martins WP, Ferriani RA, Navarro PA. Comparative analysis of the spindle and chromosome configurations of in vitro-matured oocytes from patients with endometriosis and from control subjects: a pilot study. *Fertil Steril*. 2009 Nov;92(5):1749-52. Epub 2009 Jun 12.
- Barcelos I, D., Donabela F, C., Da-Broi M, G., Ribas C, P., Meola J, Navarro P, A. Mulheres inférteis com endometriose pélvica mínima e leve submetidas à estimulação ovariana apresentam menor expressão do gene CYP19A1 em células do cumulus. *Reprod Clim*. 2013.
- Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell*. 2004; 116:281-297.
- Barnhart K, Dungs Moor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertility and sterility*. 2002;77:7.

- Bo LJ, Wei B, Li ZH, Wang ZF, Gao Z, Miao Z. Bioinformatics analysis of miRNA expression profile between primary and recurrent glioblastoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015 Oct;19(19):3579-86.
- Bulun SE, Ping Yin YHC, Imir G, et al. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 248:94–103.
- Bulun SE. Endometriosis. *The New England journal of medicine*. 2009;360(3):268-79.
- Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and sterility*. 2012;98(3):511-9.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA- target recognition. *Plos Biol*. 2005;3e85.
- Brizek CL, Schlaff S, Pellegrini VA, Frank JB, Worrilow KC. Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis--an association with endometriosis. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 1995;12(2):106-12.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 2004; 10:1957-66.
- Cahill DJ, Harlow CR, Wardle PG. Pre-ovulatory granulosa cells of infertile women with endometriosis are less sensitive to luteinizing hormone. *Am J Reprod Immunol*. 2003 Feb;49(2):66-9.
- Canipari R. Oocyte--granulosa cell interactions. *Human reproduction update*. 2000;6(3):279-89.
- Cohen, J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* New York, NW: Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, 1988.
- Combelles CM, Carabatsos MJ, Kumar TR, Matzuk MM, Albertini DF. Hormonal control of somatic cell oocyte interactions during ovarian follicle development. *Molecular reproduction and development*. 2004;69(3):347-55.
- Cox AD, Der CJ. The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* 2003; 22:8999-9006.
- Chen L, Ma H, Hu H, Gao L, Wang X, Ma J, Gao Q, Liu B, Zhou G, Liang C. Special role of Foxp3 for the specifically altered microRNAs in Regulatory T cells of HCC patients. *BMC Cancer*. 2014 Jul 7;14:489. doi: 10.1186/1471-2407-14-489.
- Chen D, Zhang Z, Chen B, Ji D, Hao Y, Zhou P, Wei Z, Cao Y. Altered microRNA and Piwi-interacting RNA profiles in cumulus cells from patients with diminished ovarian reserve. *Biol Reprod*. 2017 Jul 1;97(1):91-103. doi: 10.1093/biolre/iox062.
- Cheesman KL, Cheesman SD, Chatterton Jr RT, Cohen MR. Alterations in progesterone metabolism and luteal function in infertile women with endometriosis. *Fertil Steril* 1983;40(5):590–5.

- Choi, Y. S. et al. Alteration in the intrafollicular thiol-redox system in infertile women with endometriosis. *Reproduction*, v. 149, n. 2, p. 155-62, Feb 2015. ISSN 1741-7899.
- Crain DA, Janssen SJ, Edwards TM, Heindel J, Ho SM, Hunt P, et al. Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertility and sterility*. 2008;90(4):911-40.
- Da Broi MG, Malvezzi H, Paz CC, Ferriani RA, Navarro PA. Follicular fluid from infertile women with mild endometriosis may compromise the meiotic spindles of bovine metaphase II oocytes. *Hum Reprod*. 2014 Feb;29(2):315-23.
- Da Broi MG, de Albuquerque FO, de Andrade AZ, Cardoso RL, Jordão Junior AA, Navarro PA. Increased concentration of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in follicular fluid of infertile women with endometriosis. *Cell Tissue Res*. 2016;366(1):231-42
- Da Luz CM, Da Broi MG, Donabela FC, Paro de Paz CC, Meola J, Navarro PA. PTGS2 down-regulation in cumulus cells of infertile women with endometriosis. *Reprod Biomed Online* 2017; 1472-6483(17) 30306-1.
- Devine PJ, Perreault SD, Luderer U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. *Biol Reprod*. 2012;86(2):27.
- Díaz-Fontdevila M, Pommer R, Smith R. Cumulus cell apoptosis changes with exposure to spermatozoa and pathologies involved in infertility. *Fertil Steril*. 2009;91(5 Suppl):2061-8.
- Donabella, F. C. et al. Higher SOD1 Gene expression in cumulus cells from infertile women with moderate and severe endometriosis. *Reprod Sci*, v 22, n 11, p. 1452 -60, Nov 2015. ISSN 1933-7191.
- Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Human reproduction*. 1998;13(6):1686-90.
- Dumesic, D. A et al., Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril*, v 103, p. 303-16. Feb 2015. INSS 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (linking). Disponível em: < www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25497448.>
- Dweep, H et al. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions, *Nature Methods*, 2015; 12(8): 697-697.
- Eskenazi B, Warner M, L. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynaecol Can*. 1997.
- Erickson GF, Garzo VG, Magoffin DA. Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989 Oct;69(4):716-24.
- Furger C, Cronier L, Poirot C, Pouchelet M. Human granulosa cells in culture exhibit functional cyclic AMP-regulated gap junctions. *Molecular human reproduction*. 1996;2(8):541-8.

- Garcia Velasco JA, Arici A Is the endometrium or oocyte/embryo affected in endometriosis? Hum Reprod, v. 14 Suppl 2, p. 77-89, Dec 1999. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10690803> >.
- Garrido N, Navarro J, García-Velasco J, et al. The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. Hum Reprod Update. 2002; 8(1):95-103.
- Garrido N, Navarro J, Remohi J, Simon C, Pellicer A. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. Human reproduction update. 2000;6(1):67-74.
- Gilchrist RB. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. Reproduction, fertility, and development. 2011;23(1):23-31.
- Giorgi, V. S, Da Broi MG, Paz CC, Ferriani RA, Navarro PA. N-acetyl-cysteine and l-carnitine prevent meiotic oocyte Damage induced by follicular fluid from infertile women With mild endometriosis. Reprod Sci, v. 23, n. 3, p. 342-51, Mar 2016. ISSN 1933-7191.
- Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. Lancet. 2004;364(9447):1789-99.
- Hagenbuchner J, Ausserlechner MJ. Mitochondria and FOXO3: breath or die. Front Physiol 2013; 4:147.
- Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. Biochemical Society transactions. 2007;35(Pt 5):1147-50.
- Halme J, Becker S, Wing R. Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. American journal of obstetrics and gynecology. 1984;148(1):85-90.
- Hamamah S, Anahory T, Ferriere A, Loup V, Reyftmann L, Dechaud H. Therapeutic solutions for male infertility. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). 2009; 1 (38) Spec No 1-2:F58-64. No abstract available.
- Hamamah S, Matha V, Berthenet C, Anahory T, Loup V, Dechaud H, Hedon B, Fernandez A, Lamb N. Comparative protein expression profiling in human cumulus cells in relation to oocyte fertilization and ovarian stimulation protocol. Reprod Biomed Online. 2006;13(6):807-14.
- Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille MC, Leader A, et al. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. Human reproduction. 2008;23(5):1118-27.
- Haouzi D, Hamamah S. Pertinence of Apoptosis Markers for the Improvement of In Vitro Fertilization (IVF). Curr Med Chem. 2009;16(15):1905-16.
- Harb HM¹, Gallos ID, Chu J, Harb M, Coomarasamy A. The effect of endometriosis on in vitro fertilisation outcome: a systematic review and meta-analysis. BJOG. 2013 Oct;120(11):1308-20. doi: 10.1111/1471-0528.12366. Epub 2013 Jul 3.

- Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 2004; 117:5479-87.
- Harlow CR, Cahill DJ, Maile LA, et al. Reduced preovulatory granulosa cell steroidogenesis in women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:426–9.
- Hattori M, Minato N. Rap1 GTPase: functions, regulation, and malignancy. *J Biochem* 2003; 134:479-84 .
- Holoch KJ, Lessey BA. Endometriosis and infertility. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2010;53(2):429-38
- Holtz G, Williamson HO, Mathur RS, Landgrebe SC, Moore EE. Luteinized unruptured follicle syndrome in mild endometriosis assessment with biochemical parameters. *J Reprod Med* 1985;30(9):643–5.
- Hutt KJ, Albertini DF. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reproductive biomedicine online*. 2007;14(6):758-64.
- Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple – turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002 Sep 20; 297 (5589): 2056-60.
- Hsu AL, Townsend PM, Oehninger S, Castora FJ. Endometriosis may be associated with mitochondrial dysfunction in cumulus cells from subjects undergoing in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection, as reflected by decreased adenosine triphosphate production. *Fertil Steril*. 2015;103(2):347-52.e1.
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali m, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Queirozoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression. Dregulation in human breast câncer. *Cancer Res*. 2005 Aug; 15:65(16):7065-70.
- Kaya H, Oral B. Effect of ovarian involvement on the frequency of luteinized unruptured follicle in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 1999;48(2):123–6.
- Koks CA, Groothuis PG, Slaats P, Dunselman GA, de Goeij AF, Evers JL. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in antegradely shed menstruum and peritoneal fluid. *Fertility and sterility*. 2000;73(3):604-12.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. Na abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294:858-862.
- Lee RC, ,Feinbaum RL, Ambros V, The C. *Elegans* heterochronic gene *lin-4* encondes small RNAs with antisense complemtnarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75(5):843-54.
- Lewis B. P, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005; 120(1):15-20.
- Li WB, Chen HY, Zhang W, Yan W, Shi R, Li SW, Jiang T. Relationship between magnetic resonance imaging features and miRNA gene expression in patients with glioblastoma multiforme. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(15):2881-5.

- Li P, Yang X, Cheng Y, Zhang X, Yang C, et al., MicroRNA-218 Increases the Sensitivity of Bladder Cancer to Cisplatin by Targeting Glut1. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(3):921-932. doi: 10.1159/000460505. Epub 2017 Feb 20.
- Lin XN, Wei ML, Tong XM, Xu WH, Zhou F, Huang QX, Wen GF, Zhang SY. Outcome of in vitro fertilization in endometriosis-associated infertility: a 5-year database cohort study. *Chin Med J (Engl)*. 2012 Aug;125(15):2688-93.
- Liu, F, He L, Liu Y, Shi Y, Du H. The expression and role of oxidative stress markers in the serum and follicular fluid of patients with endometriosis. *Clin Exp Obstet Gynecol*, v. 40, n. 3, p. 372-6, 2013. ISSN 0390-6663.
- Liu SG, Qin XG, Zhao BS, Qi B, Yao WJ, Wang TY, Li HC, Wu XN. Differential expression of miRNAs in esophageal cancer tissue. *Oncol Lett*. 2013 May;5(5):1639-1642. Epub 2013 Mar 12.
- Liu Z, Wei X, Zhang A, Li C, Bai J, Dong J. Long non-coding RNA HNF1A-AS1 functioned as an oncogene and autophagy promoter in hepatocellular carcinoma through sponging hsa-miR-30b-5p. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 May 13;473(4):1268-75. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.04.054. Epub 2016 Apr 13.
- Lu Y, Ryan SL, Elliott DJ, Bignell GR, Futreal PA, Ellison DW, Bailey S, Clifford SC. Amplification and overexpression of Hsa-miR-30b, Hsa-miR-30d and KHDRBS3 at 8q24.22-q24.23 in medulloblastoma. *PLoS One*. 2009 Jul 7;4(7):e6159. doi: 10.1371/journal.pone.0006159.
- Luz, CM. Perfil diferencial de transcritos de células do cumulus oophorus de mulheres inférteis com e sem endometriose submetidas à estimulação ovariana. 2016, 77 f. Dissertação em Mestrado em Ginecologia e Obstetrícia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2016.
- Machtinger R, Rodosthenous RS, Adir M, Mansour A, Racowsky C, Baccarelli AA, Hauser R. Extracellular microRNAs in follicular fluid and their potential association with oocyte fertilization and embryo quality: an exploratory study. *J Assist Reprod Genet*. 2017 Apr;34(4):525-533. doi: 10.1007/s10815-017-0876-8. Epub 2017 Feb 10.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 2002 Sep6: 110(%): 563-574.
- Martins WP, Vieira CV, Teixeira DM, Barbosa MA, Dassunção LA, Nastri CO. Ultrasound for monitoring controlled ovarian stimulation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014;43(1):25-33.
- Moreno-Mateos MA, Barragán V, Torres B, Rodríguez-Mateo C, Méndez-Vidal C, Berezikov E, Mudduluru G, Allgayer H, Pintor-Toro JA. Novel small RNA expression libraries uncover hsa-miR-30b and hsa-miR-30c as important factors in anoikis resistance. *RNA*. 2013 Dec;19(12):1711-25. doi: 10.1261/rna.039461.113. Epub 2013 Oct 15.

- Nasiri, N. et al. Oxidative Stress Statues in Serum and Follicular Fluid of Women with Endometriosis. *Cell J*, v. 18, n. 4, p. 582-587, 2017. ISSN 2228-5806.
- Negrini M, Calin GA. Breast câncer metastasis: a microRNA story. *Breast Cancer Res.*2008;10(2):203.
- Nakanishi H, Takai Y. Roles of nectins in cell adhesion, migration and polarization. *Biol Chem* 2004; 385:885-92.
- Niu T, Liu N, Zhao M, Xie G, Zhang L et al., Niu T, Liu N, Zhao M, Xie G Identification of a novel FGFR1 MicroRNA target site polymorphism for bone mineral density in meta-analyses of genome-wide association studies. *Hum Mol Genet.* 2015 Aug 15;24(16):4710-27. doi: 10.1093/hmg/ddv144. Epub 2015 May 4.
- Ohlsson *et al.*, 2009. MicroRNA-Regulated Pathways Associated with Endometriosis. *Molecular Endocrinology.* 2009; 23(2):265-75.
- Olena AF, Patton JG. Genomic Organization of microRNAs. *J. Cell. Physiol.* 2010; 222:540-545.
- Opoien HK, Fedorcsak P, Omland AK, Abyholm T, Bjerkke S, Ertzeid G, et al. In vitro fertilization is a successful treatment in endometriosis-associated infertility. *Fertility and sterility.* 2012;97(4):912-8.
- Pan Q, Luo X, Toloubeydokhti T, Chegini The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. *Mol Hum Reprod* 2007; 13:797–806.4.
- Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A, Remohí J, Simón C. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Hum Reprod.* 1995 Dec;10 Suppl 2:91-7.
- Pellicer A, Valbuena D, Bauset C, et al. The follicular environment in stimulated cycles of women with endometriosis: esteroid levels and embryo quality. *Fertil Steril* 1998; 69:1135–41.
- Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 2002; 181-182:475-81
- Polak G, Wertel I, Barczyński B, Kwaśniewski W, Bednarek W, Kotarski J. Increased levels of oxidative stress markers in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;168(2):187-90.
- Ricarte-Filho JC, Fuziwara CS, Yamashita AS, Rezende E, da Silva MJ, Kimura ET. Effects os let-7 microRNA on cel growth and differentiation of papillary thyroid cancer. *Transl Oncol*, 2009 Dec; (2):236-41.
- Saito-Diaz K, Chen TW, Wang X, Thorne CA, Wallace HA, Page-McCaw A, Lee E. The way Wnt works: Components and mechanism. *Nat Cell Biol* 2001; 3:628-36.

- Sampson A. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity *Am J Obstet Gynecol*, 1927; 14: 442–469.
- Sampson JA. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *The American journal of pathology*. 1927;3(2):93-110 43.
- Sanchez-Lazo L, Brisard D, Elis S, Maillard V, Uzbekov R, Labas V, Desmarchais A, Papillier P, Monget P, Uzbekova S. Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cells support oocyte maturation in bovine. *Mol Endocrinol*. 2014 Sep;28(9):1502-21. doi:10.1210/me.2014-1049. Epub 2014 Jul 24.
- Santulli P, Chouzenoux S, Fiorese M, Marcellin L, Lemarchal H, Millischer AE, et al. Protein oxidative stress markers in peritoneal fluids of women with deep infiltrating endometriosis are increased. *Hum Reprod*. 2015;30(1):49-60.
- Saracoglu OF, Aksel S, Yeoman RR, Wiebe RH. Endometrial estradiol and progesterone receptors in patients with luteal phase defects and endometriosis. *Fertil Steril* 1985;43(6):851–5.
- Selam B, Arici A. Implantation defect in endometriosis: endometrium or peritoneal fluid. *J Reprod Fertil Suppl*. 2000; 55:121-8. Review.
- Senapati S, Sammel MD, Morse C, Barnhart KT. Impact of endometriosis on in vitro fertilization outcomes: an evaluation of the Society for Assisted Reproductive Technologies Database. *Fertil Steril*. 2016 Jul;106(1):164-171.e1.
- Signorile PG, Baldi A. Endometriosis: new concepts in the pathogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010;42(6):778-80.
- Singh, A. K. et al. Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. *Reprod Toxicol*, v. 42, p. 116-24, Dec 2013. ISSN 1873-1708.
- Sirotkin AV, Ovcharenko D, Grossmann R, Laukova M, Mlyncek M: Identification of microRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen. *J Cell Physiol* 2009; 219: 415-420.
- Somigliana E, Vigano P, Gaffuri B, Candiani M, Busacca M, Di Blasio AM, et al. Modulation of NK cell lytic function by endometrial secretory factors: potential role in endometriosis. *American journal of reproductive immunology*. 1996;36(5):295-300.
- Shao C, Yu Y, Yu L, Pei Y, Feng Q, Chu F, Fang Z, Zhou Y. Amplification and up-regulation of microRNA-30b in oral squamous cell cancers. *Arch Oral Biol*. 2012 Aug;57(8):1012-7.
- Shaeib F, Khan SN, Ali I, Thakur M, Saed MG, Dai J, et al. The Defensive Role of Cumulus Cells Against Reactive Oxygen Species Insult in Metaphase II Mouse Oocytes. *Reprod Sci*. 2016;23(4):498-507.

- Shanti A, Santanam N, Morales AJ, Parthasarathy S, Murphy AA. Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1999;71(6):1115-8.
- Speroff L, Fritz MA. Regulation of the Menstrual Cycle. In: Speroff L & Fritz MA. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 7 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins p. 187-231: 2005.
- Stahlhut Espinosa CE, Slack FJ. The role of microRNA in Cancer. *Yale J Biol Med*, 2006 Dec; 79(3-4):131-40. Review.
- Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular reproduction and development*. 2002;61(3):414-24.
- Teague EM, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update*. 2010 Marc-Apr; 16(2):142-65. Eup 2009 Sep 22. Review.
- Tesfaye D, Ghanem N, Carter F, Fair T, Sirard MA, Hoelker M, Schellander K, Lonergan P. Gene expression profile of cumulus cells derived from cumulus-oocyte complexes matured either in vivo or in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 2009;21(3):451-61.
- Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. *Biology of reproduction*. 2000;63(3):805-10.
- Toya M, Saito H, Ohta N, Saito T, Kaneko T, Hiroi M. Moderate and severe endometriosis is associated with alterations in the cell cycle of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*. 2000;73(2):344-50.
- Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reproductive biology and endocrinology RB&E*. 2006; 4:19.
- Van Kaam KJ, Romano A, Schouten JP, Dunselman GA, Groothuis PG. Progesterone receptor polymorphism +331G/A is associated with a decreased risk of deep infiltrating endometriosis. *Hum Reprod* 2007;22(1):129–35.
- Van Langendonckt A, Casanas-Roux F, Donnez J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertility and sterility*. 2002;77(5):861-70.
- Vinatier D, Cosson M, Dufour P. Is endometriosis an endometrial disease? *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2000;91(2):113-25.
- Wardle PG, Mitchell JD, McLaughlin EA, Ray BD, McDermott A, Hull MG. Endometriosis and ovulatory disorder: reduced fertilization in vitro compared with tubal and unexplained infertility. *Lancet* 1985; 2(8449):236-9.

- Weber, J; Senior, A. E. ATP syntesus driven by próton transport in F1F0-ATP synthase. FEBS Lett, v. 545, n. 1, p.61-70, Jun 12/2003. INSS 0014-5793 (Print).
- Xin H, Yang Y, Liu J, Li X, Li M, Feng B, Li Z, Zhang H, Li H, Shen F, Guan L, Gao L. Association between tuberculosis and circulating microRNA hsa-let-7b and hsa-miR-30b: A pilot study in a Chinese population. Tuberculosis (Edinb). 2016 Jul;99:63-9. doi: 10.1016/j.tube.2016.04.005. Epub 2016 Apr 16.
- Zhai H, Fesler A, Ba Y, Wu S, Ju J Inhibition of colorectal cancer stem cell survival and invasive potential by hsa-miR-140-5p mediated suppression of Smad2 and autophagy. Oncotarget. 2015 Aug 14;6(23):19735-46.
- Zhang X, Dong J, He Y, Zhao M, Liu Z. *et al.*, miR-218 inhibited tumor angiogenesis by targeting ROBO1 in gastric cancer. Gene. 2017 Jun 5;615:42-49. doi: 10.1016/j.gene.2017.03.022. Epub 2017 Mar 18.
- Zhang HC, Tang KF. Clinical value of integrated-signature miRNAs in esophageal cancer. Cancer Med. 2017 Jul 14. doi: 10.1002/cam4.1129. [Epub ahead of print].

8. ANEXOS

8.1. Termo de Consentimento

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO-USP
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA
Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar - Ribeirão Preto-SP - CEP 14049- 900
Fone (016) 3602-2231 - Fax (016)3633-0946
Setor de Reprodução Humana

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Grupo Controle)

1. NOME DA PESQUISA: “Perfil diferencial de microRNAs em células do *Cummulus oophorus* de mulheres inférteis com e sem endometriose submetidas à estimulação ovariana”

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro e Liliane Fabio Isidoro da Silva

Você está sendo convidada a participar da pesquisa intitulada “Perfil diferencial de microRNAs em células do *Cummulus oophorus* de mulheres inférteis com e sem endometriose submetidas à estimulação ovariana”.

A endometriose, doença na qual há endométrio (tecido que em situações normais está presente apenas na parte interna do útero) em atividade fora da cavidade uterina, apresenta elevada prevalência em mulheres em idade reprodutiva. Existe uma forte associação entre a ocorrência de endometriose e infertilidade (não ocorrência de gravidez após 12 meses de atividade sexual regular sem uso de métodos para evitar a gestação). Os mecanismos responsáveis tanto pela redução da fertilidade natural, como pelos piores resultados dos procedimentos de reprodução assistida em portadoras desta doença são pouco conhecidos, sendo questionado um possível papel prejudicial da endometriose sobre a esteroidogênese ovariana, foliculogênese e qualidade oocitária. Como os oócitos humanos são extremamente raros e a sua utilização em estudos invasivos, que impossibilitam a utilização dos mesmos nos procedimentos de reprodução assistida, geralmente não é exequível, a identificação de biomarcadores não invasivos, passíveis

de predição da qualidade oocitária, é bastante desejável. Neste contexto, as células do *Cumulus oophorus* podem ser utilizadas como biomarcadores indiretos de qualidade oocitária e resultados de fertilização *in vitro*. Pequenas moléculas de RNA (microRNAs) desempenham papel importante na regulação pós-transcricional de genes-alvo, parecem estar envolvidos na regulação esteroidogênese ovariana, foliculogênese e maturação oocitária. Acreditamos que a desregulação dessas pequenas moléculas em células do *Cumulus oophorus* possa ajudar a entender os processos envolvidos com a infertilidade observada em portadoras desta doença, o que motivou a realização do presente estudo.

Propomos avaliar se os níveis dessas pequenas moléculas (microRNAs) nas células do *Cumulus oophorus* no dia da realização da captação de óvulos. Fui informada de que o procedimento pode ocasionar discreta dor local, podendo aparecer hematomas no local da punção. Também autorizo a utilização das células da granulosa (células que envolvem o óvulo, representando a parede do folículo ovariano) obtidos, durante o procedimento de captação dos óvulos, após a identificação e separação dos óvulos pela bióloga responsável, como realizado na prática do laboratório de reprodução. Fui informada de que, após o isolamento dos óvulos, as células da granulosa (que ficam misturadas ao fluido) são desprezadas, uma vez que não apresentam qualquer utilidade para o procedimento de reprodução ao qual serei submetida.

Temos indícios de que a endometriose possa também comprometer a qualidade dos óvulos, levando a redução das chances de gravidez, mesmo quando se realizam procedimentos de reprodução assistida. Nas mulheres inférteis com endometriose e, questiona-se se um dos motivos responsáveis pela maior dificuldade em engravidar, seja a inadequada qualidade dos óvulos (oócitos), que poderão produzir embriões também de má qualidade e, conseqüentemente, gerar uma gestação menos viável. Contudo, na atualidade, não se realiza a avaliação adequada da qualidade oocitária, devido à ausência de métodos bem estabelecidos capazes de predizer se os óvulos são bons ou não. A identificação da presença de alterações nas células do cumulus de pacientes portadoras de endometriose, não somente ajudaria a elucidar o mecanismo causador da infertilidade, como também abriria perspectivas futuras de tratamento para este grupo de pacientes. Contudo, para podermos dizer se os óvulos destas pacientes com endometriose são ou não são de boa qualidade, precisamos comparar a qualidade dos mesmos com a de óvulos provenientes de um grupo de pacientes tido como grupo controle, ou seja, cuja qualidade dos óvulos seja considerada como padrão de normalidade. Desta forma, você está sendo convidada para participar deste estudo na posição de paciente do grupo controle, ou seja, cujos óvulos sejam

considerados como padrão de normalidade, para fins de comparação com os óvulos das pacientes com endometriose.

Também devemos ressaltar que a sua participação no presente estudo não implicará na realização de nenhum procedimento complementar durante o seu tratamento para tentar engravidar, com exceção da coleta de sangue no dia de início de estimulação da ovulação, no dia em que for prescrito o uso da gonadotrofina coriônica humana e no dia da realização da captação de óvulos, como descrito acima.

Sua colaboração, portanto, no fornecimento de amostras de células da granulosa, será imprescindível para um melhor conhecimento da qualidade dos oócitos de pacientes com dificuldade para engravidar devido à Endometriose. Este conhecimento no futuro poderá ser usado no sentido de propiciar um tratamento mais eficaz da infertilidade associada à Endometriose. É importante ressaltarmos que este estudo não trará nenhuma despesa para você e seu companheiro. Todo o material obtido será utilizado exclusivamente para a avaliação das células da granulosa. Autorizo, caso haja amostras remanescentes de materiais colhidos (células da granulosa), ao armazenamento das mesmas, sendo que somente poderão ser utilizadas para a realização de pesquisas futuras, caso eu dê a minha autorização expressa, mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido específico da nova(s) pesquisa(s). No caso de haver amostras remanescentes, eu assinarei um termo de consentimento específico, autorizando a sua estocagem e onde conste os tipos e quantidades de alíquotas armazenadas.

3. INFORMAÇÕES ADICIONAIS: Todos as dúvidas com relação ao estudo que, porventura, possam ocorrer durante o seu tratamento para engravidar, serão prontamente esclarecidas pelos pesquisadores responsáveis pelo presente estudo. Você tem a liberdade de retirar o seu consentimento e de deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento. Asseguramos o total sigilo em relação aos nomes dos integrantes deste estudo, bem como garantimos que será mantido o caráter confidencial de toda informação relacionada a sua privacidade. Temos o compromisso de que serão prestadas informações atualizadas durante todo o estudo, ainda que isto possa afetar a vossa vontade de continuar dele participando. Asseguramos o compromisso de que você será devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de participação neste projeto, bem como de que será garantida a continuidade do seu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Eu, _____, RG nº: _____ abaixo assinada, declaro que fui informada e estou inteiramente de acordo com o exposto acima e aceito livremente participar do estudo em questão, fornecendo amostras de células da granulosa.,. Autorizo a pesquisadora abaixo mencionada a utilizá-los para a pesquisa : “Perfil diferencial de microRNAs em células do *Cummulus oophorus* de mulheres inférteis com e sem endometriose submetidas à estimulação ovariana”, estando ciente que terei a liberdade de retirar o meu consentimento e de deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade do meu tratamento.

Ribeirão Preto _____ / _____ / _____

Assinatura- Paciente

Assinatura do Pesquisador

4. PESQUISADORA RESPONSÁVEL:

Prof. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro – CRM: 84930 – SP

Liliane Fabio Isidoro da Silva – CRBM: 13993 – SP

Telefone de contato: 16-3602-2231

Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar (Hospital das Clínicas- Setor de Reprodução Humana), Ribeirão Preto – SP. CEP: 14049-900.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO-USP**

DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar - Ribeirão Preto-SP - CEP 14049- 900

Fone (016) 3602-2231 - Fax (016)3633-0946

Setor de Reprodução Humana

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(GRUPO ENDOMETRIOSE)

1. NOME DA PESQUISA: **“Perfil diferencial de microRNAs em células do *Cummulus oophorus* de mulheres inférteis com e sem endometriose submetidas à estimulação ovariana”**
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro e Liliane Fabio Isidoro da Silva

Você está sendo convidada a participar da pesquisa intitulada “Perfil diferencial de microRNAs em células do *Cummulus oophorus* de mulheres inférteis com e sem endometriose submetidas à estimulação ovariana”.

A endometriose, doença na qual há endométrio (tecido que em situações normais está presente apenas na parte interna do útero) em atividade fora da cavidade uterina, apresenta elevada prevalência em mulheres em idade reprodutiva. Existe uma forte associação entre a ocorrência de endometriose e infertilidade (não ocorrência de gravidez após 12 meses de atividade sexual regular sem uso de métodos para evitar a gestação). Os mecanismos responsáveis tanto pela redução da fertilidade natural, como pelos piores resultados dos procedimentos de reprodução assistida em portadoras desta doença são pouco conhecidos, sendo questionado um possível papel prejudicial da endometriose sobre a esteroidogênese ovariana, foliculogênese e qualidade oocitária. Como os oócitos humanos são extremamente raros e a sua utilização em estudos invasivos, que impossibilitam a utilização dos mesmos nos procedimentos de reprodução assistida, geralmente não é exequível, a identificação de biomarcadores não invasivos, passíveis de predição da qualidade oocitária, é bastante desejável. Neste contexto, as células do *Cummulus oophorus* podem ser utilizadas como biomarcadores indiretos de qualidade oocitária e resultados de fertilização *in vitro*. Pequenas moléculas de

RNA (microRNAs) desempenham papel importante na regulação pós-transcricional de genes-alvo, parecem estar envolvidos na regulação esteroidogênese ovariana, foliculogênese e maturação oocitária. Acreditamos que a desregulação dessas pequenas moléculas em células do *Cumulus oophorus* possa ajudar a entender os processos envolvidos com a infertilidade observada em portadoras desta doença, o que motivou a realização do presente estudo.

Propomos avaliar se os níveis dessas pequenas moléculas (microRNAs) nas células do *Cumulus oophorus* no dia da realização da captação de óvulos. Fui informada de que o procedimento pode ocasionar discreta dor local, podendo aparecer hematomas no local da punção. Também autorizo a utilização das células da granulosa (células que envolvem o óvulo, representando a parede do folículo ovariano) obtidos, durante o procedimento de captação dos óvulos, após a identificação e separação dos óvulos pela bióloga responsável, como realizado na prática do laboratório de reprodução. Fui informada de que, após o isolamento dos óvulos, as células da granulosa (que ficam misturadas ao fluido) são desprezadas, uma vez que não apresentam qualquer utilidade para o procedimento de reprodução ao qual serei submetida.

Temos indícios de que a endometriose possa também comprometer a qualidade dos óvulos, levando a redução das chances de gravidez, mesmo quando se realizam procedimentos de reprodução assistida. Nas mulheres inférteis com endometriose e, questiona-se se um dos motivos responsáveis pela maior dificuldade em engravidar, seja a inadequada qualidade dos óvulos (oócitos), que poderão produzir embriões também de má qualidade e, conseqüentemente, gerar uma gestação menos viável. Contudo, na atualidade, não se realiza a avaliação adequada da qualidade oocitária, devido à ausência de métodos bem estabelecidos capazes de predizer se os óvulos são bons ou não. A identificação da presença de alterações nas células do cumulus de pacientes portadoras de endometriose, não somente ajudaria a elucidar o mecanismo causador da infertilidade, como também abriria perspectivas futuras de tratamento para este grupo de pacientes. Contudo, para podermos dizer se os óvulos destas pacientes com endometriose são ou não são de boa qualidade, precisamos comparar a qualidade dos mesmos com a de óvulos provenientes de um grupo de pacientes tido como grupo controle, ou seja, cuja qualidade dos óvulos seja considerada como padrão de normalidade. Desta forma, você está sendo convidada para participar deste estudo na posição de paciente do grupo controle, ou seja, cujos óvulos sejam considerados como padrão de normalidade, para fins de comparação com os óvulos das pacientes com endometriose.

Também devemos ressaltar que a sua participação no presente estudo não implicará na realização de nenhum procedimento complementar durante o seu tratamento para tentar engravidar, com exceção da coleta de sangue no dia de início de estimulação da ovulação, no dia em que for prescrito o uso da gonadotrofina coriônica humana e no dia da realização da captação de óvulos, como descrito acima.

Sua colaboração, portanto, no fornecimento de amostras de células da granulosa, será imprescindível para um melhor conhecimento da qualidade dos oócitos de pacientes com dificuldade para engravidar devido à Endometriose. Este conhecimento no futuro poderá ser usado no sentido de propiciar um tratamento mais eficaz da infertilidade associada à Endometriose. É importante ressaltarmos que este estudo não trará nenhuma despesa para você e seu companheiro. Todo o material obtido será utilizado exclusivamente para a avaliação das células da granulosa. Autorizo, caso haja amostras remanescentes de materiais colhidos (células da granulosa), ao armazenamento das mesmas, sendo que somente poderão ser utilizadas para a realização de pesquisas futuras, caso eu dê a minha autorização expressa, mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido específico da nova(s) pesquisa(s). No caso de haver amostras remanescentes, eu assinarei um termo de consentimento específico, autorizando a sua estocagem e onde conste os tipos e quantidades de alíquotas armazenadas.

3. INFORMAÇÕES ADICIONAIS: Todos as dúvidas com relação ao estudo que, porventura, possam ocorrer durante o seu tratamento para engravidar, serão prontamente esclarecidas pelos pesquisadores responsáveis pelo presente estudo. Você tem a liberdade de retirar o seu consentimento e de deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento. Asseguramos o total sigilo em relação aos nomes dos integrantes deste estudo, bem como garantimos que será mantido o caráter confidencial de toda informação relacionada a sua privacidade. Temos o compromisso de que serão prestadas informações atualizadas durante todo o estudo, ainda que isto possa afetar a vossa vontade de continuar dele participando. Asseguramos o compromisso de que você será devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de participação neste projeto, bem como de que será garantida a continuidade do seu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Eu, _____, RG nº: _____ abaixo assinada, declaro que fui informada e estou inteiramente de acordo com o exposto acima e aceito livremente participar do estudo em questão, fornecendo amostras de células da

granulosa,. Autorizo a pesquisadora abaixo mencionada a utilizá-los para a pesquisa : “Perfil diferencial de microRNAs em células do *Cummulus oophorus* de mulheres inférteis com e sem endometriose submetidas à estimulação ovariana”, estando ciente que terei a liberdade de retirar o meu consentimento e de deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade do meu tratamento.

Ribeirão Preto _____ / _____ / _____

Assinatura- Paciente

Assinatura do Pesquisador

5. PESQUISADORA RESPONSÁVEL:

Prof. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro – CRM: 84930 – SP

Liliane Fabio Isidoro da Silva – CRBM: 13993 – SP

Telefone de contato: 16-3602-2231

Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar (Hospital das Clínicas- Setor de Reprodução Humana), Ribeirão Preto – SP. CEP: 14049-900.

8.2. Protocolo de Extração de RNA total (Kit mirVana™miRNA Isolation)

As amostras foram centrifugadas a 4.000rpm por 5 minutos a 4°C. Em seguida, foi adicionou-se 300µl de “Cell Disreption Buffer” gelado em cada amostras. As amostras foram homogeneizadas usando Politron e mantidas no gelo. Adicionou-se 300µl de “Denaturing Solution” e homogeneizadas com a pipeta e incubadas por 5 minutos no gelo. Acrescentou-se 600µl do Acid – Phenol Choroform e agitamos durante 60 segundos no vortex. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos em velocidade máxima (> 10.000g) em temperatura ambiente. Após a centrifugação verificou-se a formação de 3 fases. Cuidadosamente, removeu-se a fase superior (fase aquosa) e transferiu-se para um novo microtubo. Adicionou-se 1,25 volume de etanol 100% (o volume retirado da fase aquosa multiplicado por 1,25). Após misturar completamente o mesmo foi transferido para um novo microtubo com filtro. Centrifugou-se por 1 minuto a 10.000g em temperatura ambiente. Descartou-se o que passou pelo filtro e repetimos a pipetagem até que a mistura de fase aquosa + etanol 100% passe toda pelo filtro. Adicionou-se 700µl de “miRNA Wash Solution 1” no filtro e centrifugou-se por 1 minuto a 10.000g em temperatura ambiente. Descartou-se novamente o que passou pelo filtro e reservou-se o tubo coletor e o filtro. Adicionou-se 500µl de “Wash Solution 2/3” no filtro e novamente centrifugou-se a 1 minuto a 10.000g em temperatura ambiente. Descartou-se o que passou pelo filtro e reservou-se o tubo coletor. Novamente, adicionou-se 500µl de “Wash Solution 2/3” no filtro e centrifugou-se a 1 minuto a 10.000g em temperatura ambiente. Transferiu-se o “Filtro Cartridge” para um novo tubo coletor. Pipetou-se no centro do “Filtro Cartridge” 40µl de água RNase free previamente aquecida a 95°C no banho maria. Centrifugou-se por 1 minuto a 10.000g em temperatura ambiente.

8.3. Expressão dos microRNAs analisados.

Micro	Grupo	N	Mean	Std Dev	Median	Lower Quartile	Upper Quartile	Minimum	Maximum	P-valor
dme-miR-7	Controle	5	0,41	0,59	0,17	0,14	0,23	0,05	1,46	0.08943
	Endo I/II	5	0,04	0,04	0,03	0,03	0,05	0	0,11	
	Endo III/IV	5	0,14	0,18	0,07	0,01	0,18	0,01	0,42	
hsa-let-7a#	Controle	4	0,86	1,12	0,36	0,23	1,49	0,19	2,52	0.2878
	Endo I/II	5	0,41	0,26	0,48	0,26	0,62	0,04	0,67	
	Endo III/IV	3	1,04	0,61	0,93	0,49	1,69	0,49	1,69	
hsa-let-7a	Controle	5	0,65	0,3	0,74	0,34	0,9	0,33	0,97	0.4317
	Endo I/II	5	0,41	0,26	0,48	0,26	0,62	0,04	0,67	
	Endo III/IV	5	0,49	0,46	0,33	0,13	0,79	0,05	1,15	
hsa-let-7b#	Controle	4	0	0	0	0	0,01	0	0,01	0.2259
	Endo I/II	4	0,02	0,03	0,01	0	0,04	0	0,06	
	Endo III/IV	3	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01	0,03	
hsa-let-7b	Controle	5	0,92	0,12	0,91	0,91	0,92	0,76	1,1	0.2982
	Endo I/II	5	0,71	0,32	0,85	0,64	0,93	0,17	0,95	

hsa-let-7c	Endo III/IV	5	0,64	0,57	0,48	0,39	0,67	0,07	1,59	0.6766
	Controle	5	0,85	0,46	0,76	0,63	0,76	0,46	1,65	
	Endo I/II	5	0,62	0,42	0,54	0,34	1,06	0,12	1,06	
	Endo III/IV	5	0,62	0,55	0,47	0,22	1,01	0,05	1,35	
hsa-let-7d	Controle	5	2,84	1	2,6	2,4	2,62	2	4,56	0.4152
	Endo I/II	5	1,65	1,08	2,2	0,92	2,4	0,12	2,61	
	Endo III/IV	5	2,31	2,24	1,42	0,69	4,32	0,05	5,06	
	Controle	5	1,52	0,84	1,22	1,09	1,43	0,87	2,97	
hsa-let-7e#	Endo I/II	4	0,73	0,76	0,44	0,21	1,24	0,21	1,83	0.2521
	Endo III/IV	4	4,02	3,46	4,13	1,17	6,88	0,14	7,7	
	Controle	5	1,56	1,07	1,27	1,04	1,29	0,76	3,44	
	Endo I/II	5	0,68	0,46	0,96	0,31	0,97	0,06	1,09	
hsa-let-7e	Endo III/IV	5	1,03	0,7	0,9	0,83	1,49	0,04	1,88	0.3296
	Controle	5	0,89	0,69	0,85	0,45	1,01	0,17	1,98	
	Endo I/II	5	0,49	0,32	0,61	0,27	0,75	0,06	0,77	
	Endo III/IV	4	0,98	0,93	0,74	0,25	1,7	0,24	2,18	
hsa-let-7f-1#	Controle	5	2,96	1,47	3,37	1,51	4,22	1,32	4,4	0.6057

hsa-let-7f-2#	Endo I/II	5	1,05	0,95	1,08	0,26	1,18	0,2	2,55	0.01914
	Endo III/IV	3	5,27	2,46	4,78	3,09	7,94	3,09	7,94	
	Controle	5	6,49	3,66	4,76	4,67	5,6	4,43	12,99	
	Endo I/II	4	4,83	2,81	3,96	3,14	6,53	2,49	8,92	0.5853
	Endo III/IV	5	6,2	6,2	5,79	0,33	10,53	0,16	14,2	
hsa-let-7g#	Controle	5	0,59	0,5	0,66	0,16	0,81	0,03	1,27	
	Endo I/II	3	0,69	0,42	0,87	0,2	0,99	0,2	0,99	0.7659
	Endo III/IV	3	0,69	0,4	0,67	0,3	1,1	0,3	1,1	
hsa-let-7g	Controle	5	1,12	0,46	1,19	0,89	1,46	0,47	1,61	
	Endo I/II	5	0,72	0,53	0,81	0,39	0,95	0,04	1,41	0.4819
	Endo III/IV	5	1	0,8	0,73	0,57	1,59	0,07	2,05	
hsa-let-7i#	Controle	4	1,72	1,76	1,18	0,48	2,96	0,31	4,21	
	Endo I/II	4	0,77	0,42	0,87	0,44	1,1	0,22	1,11	0.4981
	Endo III/IV	3	2,97	3	2,51	0,23	6,18	0,23	6,18	
hsa-miR-100#	Controle	4	6,54	9,91	1,79	1,35	11,73	1,18	21,39	
	Endo I/II	4	7,34	7,21	7,03	1,11	13,56	1,02	14,28	0.9738
	Endo III/IV	3	4,04	2,8	3,65	1,45	7,02	1,45	7,02	

hsa-miR-100	Controle	5	1,67	0,9	1,36	0,95	2,3	0,82	2,91	0.99
	Endo I/II	5	1,45	0,75	1,65	1,24	1,68	0,33	2,37	
	Endo III/IV	5	2,39	2,16	1,23	0,81	4,54	0,43	4,93	
hsa-miR-101	Controle	5	0,39	0,47	0,27	0,14	0,29	0,02	1,21	0.3086
	Endo I/II	5	0,1	0,06	0,11	0,06	0,14	0,03	0,18	
	Endo III/IV	4	0,45	0,42	0,4	0,1	0,81	0,08	0,94	
hsa-miR-103	Controle	5	0,43	0,26	0,34	0,29	0,46	0,2	0,86	0.6451
	Endo I/II	5	0,23	0,11	0,29	0,24	0,3	0,04	0,3	
	Endo III/IV	5	0,79	0,98	0,2	0,1	1,39	0,02	2,24	
hsa-miR-106a	Controle	5	0,82	0,31	0,85	0,78	1,06	0,33	1,1	0.1075
	Endo I/II	5	0,5	0,22	0,61	0,42	0,64	0,14	0,66	
	Endo III/IV	5	0,44	0,21	0,42	0,34	0,6	0,16	0,68	
hsa-miR-106b#	Controle	5	1,12	0,92	0,62	0,59	1,32	0,43	2,66	0.4764
	Endo I/II	5	0,54	0,54	0,3	0,28	0,7	0,01	1,41	
	Endo III/IV	4	1,21	1,7	0,53	0,27	2,15	0,04	3,73	
hsa-miR-106b	Controle	5	0,34	0,33	0,26	0,13	0,28	0,1	0,9	0.4049
	Endo I/II	5	0,13	0,06	0,13	0,08	0,19	0,07	0,19	

hsa-miR-107	Endo III/IV	5	0,26	0,24	0,17	0,08	0,44	0,03	0,59	0.742
	Controle	5	0,92	0,42	0,8	0,59	1,29	0,49	1,42	
	Endo I/II	4	0,73	0,45	0,68	0,38	1,08	0,27	1,29	
	Endo III/IV	4	1,68	1,61	1,38	0,36	3	0,33	3,62	
hsa-miR-10a	Controle	5	1,4	0,9	1,05	0,86	1,59	0,6	2,88	0.8969
	Endo I/II	4	21,01	39,99	1,41	0,7	41,33	0,24	80,99	
	Endo III/IV	4	1,89	1,83	1,92	0,31	3,47	0,16	3,56	
	Controle	5	0,57	0,67	0,36	0,26	0,4	0,09	1,75	
hsa-miR-10b#	Endo I/II	3	1,62	2,74	0,06	0,01	4,77	0,01	4,77	0.6054
	Endo III/IV	4	0,21	0,17	0,15	0,12	0,3	0,09	0,46	
	Controle	5	0,61	0,21	0,56	0,45	0,8	0,39	0,86	
	Endo I/II	5	0,18	0,16	0,13	0,11	0,16	0,04	0,44	
hsa-miR-1180	Endo III/IV	5	0,59	0,61	0,23	0,21	1,15	0,01	1,35	0.08458
	Controle	5	0,02	0,04	0	0	0	0	0,08	
	Endo I/II	5	0,3	0,66	0	0	0	0	1,49	
	Endo III/IV	5	0,38	0,53	0	0	0,83	0	1,07	
hsa-miR-1201	Controle	5	1,47	0,91	1,6	0,89	2,3	0,23	2,34	

hsa-miR-1208	Endo I/II	5	1,72	1,43	1,38	0,61	2,26	0,41	3,92	0.7634
	Endo III/IV	5	5,06	7,16	2,05	0,95	4,33	0,4	17,58	
	Controle	5	0,02	0,02	0,02	0,01	0,03	0,01	0,05	
	Endo I/II	5	0,03	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02	0,06	0.8869
	Endo III/IV	5	0,05	0,07	0,02	0,02	0,06	0	0,17	
hsa-miR-122	Controle	5	0,87	1,1	0,12	0,12	1,6	0,06	2,47	
	Endo I/II	4	1,49	1,69	0,8	0,54	2,43	0,35	4	0.2051
	Endo III/IV	4	0,27	0,24	0,23	0,09	0,45	0,03	0,59	
hsa-miR-1225-3P	Controle	5	2,32	1,13	2,04	1,32	3,33	1,23	3,66	
	Endo I/II	5	2,24	1,11	1,72	1,37	3,26	1,25	3,61	0.2299
	Endo III/IV	5	1	0,69	1,34	0,47	1,47	0,08	1,66	
hsa-miR-1226#	Controle	5	0,74	0,91	0,29	0,2	0,73	0,15	2,32	
	Endo I/II	4	0,4	0,31	0,41	0,14	0,67	0,11	0,7	0.7086
	Endo III/IV	4	0,73	0,79	0,37	0,29	1,17	0,28	1,92	
hsa-miR-1227	Controle	5	1,17	0,82	1,24	0,38	1,89	0,29	2,04	
	Endo I/II	5	0,6	0,58	0,35	0,23	0,75	0,12	1,56	0.3923
	Endo III/IV	4	0,58	0,25	0,49	0,41	0,75	0,38	0,95	

hsa-miR-1233	Controle	4	1163,69	2327,1	0,2	0,11	2327,28	0,04	4654,34	0.9426
	Endo I/II	3	0,61	0,69	0,42	0,02	1,37	0,02	1,37	
	Endo III/IV	3	0,4	0,52	0,13	0,08	1	0,08	1	
hsa-miR-1244	Controle	5	0,5	0,09	0,52	0,45	0,55	0,36	0,61	0.9458
	Endo I/II	5	0,47	0,44	0,46	0,09	0,72	0,02	1,07	
	Endo III/IV	4	0,46	0,3	0,44	0,25	0,67	0,11	0,84	
hsa-miR-1247	Controle	4	3,94	3,6	3,19	1,04	6,84	0,93	8,46	0.926
	Endo I/II	4	35,57	67,8	2,29	0,74	70,4	0,44	137,26	
	Endo III/IV	4	3,56	2,17	2,86	2,27	4,85	1,8	6,73	
hsa-miR-1248	Controle	5	1,01	0,99	0,73	0,4	0,88	0,3	2,73	0.1789
	Endo I/II	4	2,7	2,08	1,95	1,35	4,06	1,19	5,73	
	Endo III/IV	4	1,07	1,27	0,55	0,28	1,86	0,25	2,95	
hsa-miR-1249	Controle	5	0,74	0,4	0,73	0,68	0,99	0,12	1,19	0.9078
	Endo I/II	5	0,87	0,74	0,77	0,26	1,42	0,1	1,82	
	Endo III/IV	3	0,86	0,58	0,9	0,26	1,42	0,26	1,42	
hsa-miR-1254	Controle	4	0,67	0,79	0,33	0,25	1,1	0,17	1,86	0.9364
	Endo I/II	5	0,47	0,34	0,46	0,17	0,61	0,14	0,97	

hsa-miR-1255B	Endo III/IV	5	0,39	0,24	0,25	0,22	0,64	0,18	0,65	0.1824
	Controle	5	2,8	3,47	0,73	0,42	4,46	0,21	8,15	
	Endo I/II	5	0,76	0,28	0,79	0,59	0,99	0,38	1,07	
hsa-miR-125a- 3p	Endo III/IV	4	0,34	0,21	0,37	0,17	0,51	0,09	0,53	0.6126
	Controle	5	2,7	2,34	1,71	1,39	3,27	0,62	6,52	
	Endo I/II	5	2,24	0,76	2,34	2,13	2,58	1,06	3,11	
hsa-miR-125a- 5p	Endo III/IV	5	1,79	0,36	1,81	1,48	2,08	1,36	2,2	0.2209
	Controle	5	1,95	0,8	1,94	1,49	2,62	0,88	2,83	
	Endo I/II	5	3,1	2,51	2,38	1,55	2,82	1,29	7,45	
hsa-miR-125b	Endo III/IV	5	1,25	0,95	0,89	0,59	1,55	0,46	2,77	0.9324
	Controle	5	0,81	0,44	0,79	0,54	0,85	0,36	1,51	
	Endo I/II	5	1,24	0,97	1,06	0,68	1,46	0,24	2,78	
hsa-miR-125b- 2#	Endo III/IV	5	1,66	1,78	0,52	0,4	3,51	0,18	3,69	0.7334
	Controle	5	1,87	0,69	2,28	1,14	2,29	1,09	2,53	
	Endo I/II	5	1,33	1,65	1,15	0,11	1,16	0,09	4,12	
hsa-miR-126#	Endo III/IV	5	2,27	2,09	2,86	0,41	2,96	0,01	5,11	
	Controle	5	2,18	4,03	0,55	0,27	0,62	0,08	9,38	

hsa-miR-1260	Endo I/II	5	0,55	0,82	0,17	0,12	0,47	0	1,99	0.6561
	Endo III/IV	4	0,4	0,36	0,35	0,16	0,65	0,02	0,89	
	Controle	5	10,62	21,61	1,06	0,73	1,65	0,38	49,27	
	Endo I/II	5	1,59	1,93	0,73	0,62	1,44	0,22	4,95	0.4449
	Endo III/IV	5	0,7	0,67	0,35	0,3	1,13	0,08	1,66	
hsa-miR-126	Controle	5	0,41	0,66	0,16	0,07	0,23	0,03	1,59	
	Endo I/II	5	0,14	0,15	0,12	0,03	0,18	0,02	0,37	0.2982
	Endo III/IV	5	0,06	0,04	0,05	0,04	0,06	0,01	0,13	
hsa-miR-1262	Controle	5	0,13	0,19	0,05	0,03	0,07	0,01	0,47	
	Endo I/II	4	0,3	0,31	0,28	0,03	0,56	0,02	0,6	0.6462
	Endo III/IV	5	0,17	0,25	0,07	0,07	0,08	0,01	0,62	
hsa-miR-1270	Controle	5	1	0,65	1	0,46	1,18	0,39	1,99	
	Endo I/II	5	0,32	0,21	0,2	0,17	0,48	0,16	0,62	0.1054
	Endo III/IV	5	0,63	0,4	0,39	0,37	0,72	0,37	1,29	
hsa-miR-127	Controle	5	0,85	0,58	1,02	0,39	1,04	0,17	1,62	
	Endo I/II	5	0,72	0,41	0,61	0,51	1,08	0,19	1,19	0.9704
	Endo III/IV	5	0,81	0,65	0,68	0,43	0,88	0,17	1,87	

hsa-miR-1271	Controle	5	0,87	0,69	0,86	0,39	1,35	0,03	1,72	0.6126
	Endo I/II	5	1,11	0,6	1,04	0,94	1,14	0,4	2,06	
	Endo III/IV	5	1,34	0,97	1,2	1,11	1,46	0,11	2,81	
hsa-miR-1274A	Controle	5	0,53	0,49	0,37	0,22	0,64	0,08	1,32	0.1451
	Endo I/II	5	0,67	0,94	0,36	0,12	0,42	0,11	2,34	
	Endo III/IV	5	0,13	0,1	0,11	0,06	0,21	0,03	0,25	
hsa-miR-1274B	Controle	5	0,85	0,49	0,82	0,7	0,94	0,2	1,57	0.1479
	Endo I/II	5	2,16	3,65	0,53	0,42	0,8	0,36	8,68	
	Endo III/IV	5	0,38	0,27	0,29	0,17	0,49	0,15	0,8	
hsa-miR-1275	Controle	5	0,49	0,36	0,54	0,27	0,6	0,05	1	0.7558
	Endo I/II	5	0,47	0,15	0,44	0,37	0,57	0,31	0,68	
	Endo III/IV	5	0,66	0,42	0,47	0,46	0,58	0,4	1,4	
hsa-miR-1276	Controle	5	2,22	1,37	2,34	1,18	2,69	0,71	4,2	0.6126
	Endo I/II	5	1,33	0,47	1,49	0,94	1,7	0,73	1,79	
	Endo III/IV	5	1,77	1,69	1,68	0,41	1,87	0,36	4,51	
hsa-miR-1285	Controle	5	1,5	1,25	1,1	1,07	1,21	0,43	3,67	0.2491
	Endo I/II	5	0,77	0,45	0,59	0,52	0,95	0,31	1,46	

hsa-miR-128a	Endo III/IV	5	0,58	0,43	0,6	0,21	0,77	0,12	1,18	0.3055
	Controle	5	1,13	0,48	1,16	0,76	1,24	0,63	1,87	
	Endo I/II	5	0,74	0,25	0,83	0,57	0,85	0,42	1,05	
	Endo III/IV	4	1,3	0,77	1,26	0,74	1,87	0,42	2,26	
hsa-miR-1290	Controle	4	0,54	0,54	0,34	0,2	0,87	0,15	1,33	0.7408
	Endo I/II	5	0,47	0,43	0,36	0,24	0,41	0,13	1,21	
	Endo III/IV	5	0,29	0,17	0,31	0,22	0,33	0,06	0,52	
	Controle	5	29,17	36,41	17,06	3,17	33,79	1,77	90,07	
hsa-miR-129	Endo I/II	3	73,61	48,03	47,61	44,18	129,04	44,18	129,04	0.1788
	Endo III/IV	3	58,4	57,13	37,71	14,49	122,99	14,49	122,99	
	Controle	5	0,99	0,87	0,91	0,32	1,19	0,17	2,36	
	Endo I/II	5	0,13	0,17	0,06	0,03	0,09	0,02	0,43	
hsa-miR-1291	Endo III/IV	5	0,23	0,26	0,13	0,09	0,23	0	0,68	0.04243
	Controle	5	3,03	1,11	2,51	2,45	4,02	1,8	4,39	
	Endo I/II	4	0,45	0,18	0,47	0,3	0,61	0,28	0,61	
	Endo III/IV	4	8,51	14	2,17	0,65	16,37	0,28	29,42	
hsa-miR-1296	Controle	5	0,82	1,28	0,28	0,16	0,54	0,03	3,07	0.05625
hsa-miR-1298	Endo I/II	5	0,58	0,43	0,6	0,21	0,77	0,12	1,18	
	Controle	5	1,13	0,48	1,16	0,76	1,24	0,63	1,87	
	Endo I/II	5	0,74	0,25	0,83	0,57	0,85	0,42	1,05	
	Endo III/IV	4	1,3	0,77	1,26	0,74	1,87	0,42	2,26	

hsa-miR-1300	Endo I/II	5	0,5	0,51	0,26	0,15	0,84	0,02	1,22	0.9704
	Endo III/IV	5	0,83	1,18	0,42	0,13	0,68	0,04	2,89	
	Controle	4	0,4	0,47	0,22	0,13	0,66	0,06	1,09	
	Endo I/II	4	0,68	0,75	0,43	0,24	1,12	0,08	1,78	0.2727
	Endo III/IV	3	0,13	0,05	0,15	0,07	0,16	0,07	0,16	
hsa-miR-1303	Controle	5	1,09	0,58	1	0,81	1,64	0,3	1,68	
	Endo I/II	5	0,27	0,37	0,09	0,05	0,3	0,02	0,89	0.06311
	Endo III/IV	4	1,2	1,28	0,82	0,38	2,02	0,13	3,05	
hsa-miR-1305	Controle	5	0,43	0,55	0,21	0,19	0,22	0,1	1,41	
	Endo I/II	5	1,05	0,4	1,01	0,77	1,4	0,57	1,49	0.208
	Endo III/IV	5	0,8	0,73	0,64	0,23	1,24	0,05	1,82	
hsa-miR-130a	Controle	5	0,67	0,26	0,81	0,55	0,84	0,27	0,88	
	Endo I/II	5	0,54	0,29	0,51	0,47	0,71	0,14	0,9	0.1511
	Endo III/IV	5	0,32	0,21	0,29	0,2	0,46	0,06	0,59	
hsa-miR-130b#	Controle	5	0,82	0,73	0,61	0,26	1,06	0,2	1,98	
	Endo I/II	4	1,73	1,05	1,53	1,1	2,36	0,68	3,19	0.2285
	Endo III/IV	3	1,18	0,35	1,35	0,79	1,42	0,79	1,42	

hsa-miR-130b	Controle	5	1,15	0,41	1,35	1,06	1,44	0,48	1,44	0.1367
	Endo I/II	5	0,98	0,53	1,22	1,13	1,26	0,03	1,26	
	Endo III/IV	5	0,65	0,5	0,82	0,27	0,92	0,01	1,24	
hsa-miR-132#	Controle	5	1,15	0,81	1,27	0,44	1,52	0,28	2,25	0.338
	Endo I/II	3	0,69	0,67	0,34	0,26	1,46	0,26	1,46	
	Endo III/IV	4	3,29	4,4	1,5	0,61	5,98	0,38	9,79	
hsa-miR-132	Controle	5	0,8	0,46	0,77	0,43	1,03	0,32	1,46	0.5273
	Endo I/II	5	0,53	0,34	0,42	0,35	0,48	0,27	1,12	
	Endo III/IV	5	0,59	0,33	0,58	0,57	0,69	0,1	1,01	
hsa-miR-133a	Controle	5	0,44	0,44	0,24	0,2	0,44	0,14	1,21	0.68
	Endo I/II	5	1,05	1,62	0,41	0,3	0,46	0,14	3,93	
	Endo III/IV	4	0,33	0,08	0,35	0,27	0,38	0,21	0,39	
hsa-miR-135a	Controle	5	0,84	0,87	0,39	0,24	1,71	0,01	1,84	0.8781
	Endo I/II	5	0,66	0,49	0,67	0,42	0,81	0,03	1,36	
	Endo III/IV	5	0,88	0,58	1,1	0,6	1,14	0,03	1,54	
hsa-miR-135b#	Controle	5	0,21	0,1	0,16	0,15	0,27	0,12	0,37	0.06266
	Endo I/II	5	0,27	0,2	0,35	0,08	0,41	0,04	0,49	

hsa-miR-135b	Endo III/IV	5	0,5	0,23	0,53	0,42	0,53	0,2	0,84	0.99
	Controle	5	0,96	0,78	0,83	0,48	0,87	0,33	2,3	
	Endo I/II	5	0,8	0,4	0,65	0,63	0,87	0,41	1,45	
	Endo III/IV	5	1,1	1,14	0,7	0,56	1,13	0,08	3,02	
	Controle	5	1,08	0,74	0,97	0,66	1,32	0,26	2,21	
hsa-miR-136#	Endo I/II	5	0,38	0,46	0,2	0,1	0,35	0,06	1,18	0.3296
	Endo III/IV	5	0,99	1,29	0,47	0,03	1,38	0,01	3,07	
	Controle	4	1,66	0,2	1,73	1,53	1,78	1,37	1,8	
hsa-miR-138	Endo I/II	4	1,04	1,31	0,48	0,26	1,82	0,21	2,99	0.3342
	Endo III/IV	4	1,2	0,83	0,87	0,74	1,66	0,62	2,43	
	Controle	4	0,41	0,4	0,32	0,12	0,7	0,03	0,96	
hsa-miR-139- 3p	Endo I/II	3	0,23	0,15	0,28	0,07	0,35	0,07	0,35	0.7877
	Endo III/IV	4	0,82	1,1	0,41	0,15	1,48	0,01	2,44	
	Controle	5	0,58	0,41	0,61	0,46	0,62	0,03	1,18	
hsa-miR-139- 5p	Endo I/II	5	0,52	0,35	0,65	0,34	0,69	0	0,92	0.2982
	Endo III/IV	4	0,24	0,11	0,22	0,17	0,31	0,14	0,39	
	Controle	5	0,94	0,53	0,97	0,42	1,41	0,39	1,51	

hsa-miR-140-3p	Endo I/II	5	0,47	0,29	0,37	0,28	0,73	0,17	0,82	0.1409
	Endo III/IV	5	0,4	0,36	0,19	0,18	0,45	0,16	1,01	
hsa-miR-141#	Controle	5	1,22	1,55	0,39	0,34	1,18	0,28	3,92	
	Endo I/II	5	0,62	0,22	0,66	0,48	0,72	0,33	0,91	0.3396
	Endo III/IV	5	0,36	0,41	0,11	0,09	0,5	0,07	1,02	
hsa-miR-141	Controle	4	0,95	0,47	0,84	0,6	1,3	0,55	1,58	
	Endo I/II	4	27,77	54,49	0,76	0,37	55,17	0,05	109,51	1
	Endo III/IV	4	1,2	1,06	0,84	0,52	1,89	0,39	2,74	
hsa-miR-142-3p	Controle	5	0,25	0,46	0,06	0,03	0,07	0,02	1,07	
	Endo I/II	5	0,03	0,01	0,04	0,03	0,04	0,02	0,05	0.5326
	Endo III/IV	5	0,08	0,07	0,06	0,03	0,13	0,01	0,17	
hsa-miR-143	Controle	5	0,75	0,47	0,71	0,45	0,86	0,23	1,47	
	Endo I/II	5	0,92	1,52	0,22	0,08	0,69	0,01	3,6	0.5052
	Endo III/IV	4	0,59	0,53	0,51	0,21	0,98	0,05	1,3	
hsa-miR-144#	Controle	5	0,34	0,7	0,02	0,02	0,05	0	1,59	
	Endo I/II	5	0,01	0,02	0	0	0	0	0,04	0.3426
	Endo III/IV	5	0,1	0,14	0,01	0,01	0,13	0	0,32	

hsa-miR-145#	Controle	5	1,15	1,24	0,67	0,36	1,45	0,1	3,18	0.8865
	Endo I/II	3	0,6	0,25	0,57	0,37	0,87	0,37	0,87	
	Endo III/IV	4	0,82	0,42	0,71	0,52	1,11	0,44	1,4	
hsa-miR-145	Controle	5	1,66	2,1	0,57	0,53	1,6	0,31	5,32	0.2645
	Endo I/II	5	2,49	2,81	0,84	0,42	4,31	0,33	6,57	
	Endo III/IV	5	0,6	0,59	0,32	0,26	0,67	0,16	1,6	
hsa-miR-146a	Controle	5	0,53	0,45	0,5	0,21	0,52	0,13	1,27	0.1119
	Endo I/II	5	0,29	0,14	0,24	0,22	0,25	0,2	0,54	
	Endo III/IV	5	0,14	0,09	0,15	0,09	0,16	0,03	0,26	
hsa-miR-146b-5p	Controle	5	1,02	0,13	0,97	0,95	0,99	0,93	1,25	0.8106
	Endo I/II	5	0,79	0,49	0,9	0,37	1,25	0,2	1,25	
	Endo III/IV	5	0,88	0,39	0,94	0,84	1,07	0,26	1,3	
hsa-miR-146b-3p	Controle	5	0,85	0,55	0,87	0,68	0,95	0,1	1,64	0.1062
	Endo I/II	4	1,62	0,65	1,71	1,16	2,07	0,75	2,31	
	Endo III/IV	5	2,47	2,02	2,12	1,27	2,14	0,88	5,95	
hsa-miR-148a	Controle	5	0,56	0,29	0,64	0,58	0,74	0,06	0,77	0.8869
	Endo I/II	5	0,48	0,17	0,42	0,37	0,52	0,34	0,75	

hsa-miR-151-5P	Endo I/II	5	0,59	0,9	0,23	0,16	0,32	0,05	2,19	0.3679
	Endo III/IV	5	1,27	1,26	1,56	0,1	1,61	0,01	3,06	
hsa-miR-152	Controle	5	0,6	0,33	0,66	0,56	0,76	0,06	0,94	0.9324
	Endo I/II	5	0,77	0,62	0,69	0,68	0,75	0,01	1,74	
	Endo III/IV	5	0,64	0,5	0,58	0,31	0,84	0,11	1,39	
hsa-miR-154#	Controle	5	0,81	0,74	0,45	0,36	0,79	0,35	2,08	0.1101
	Endo I/II	3	0,43	0,41	0,37	0,06	0,87	0,06	0,87	
	Endo III/IV	3	1,79	1,54	0,92	0,9	3,57	0,9	3,57	
hsa-miR-155	Controle	5	0,81	0,74	0,45	0,36	0,79	0,35	2,08	0.5326
	Endo I/II	5	0,43	0,22	0,39	0,29	0,54	0,18	0,75	
	Endo III/IV	5	0,52	0,46	0,27	0,18	0,98	0,12	1,05	
hsa-miR-15a#	Controle	5	0,98	0,64	0,95	0,69	1,34	0,13	1,82	0.08691
	Endo I/II	5	0,26	0,19	0,16	0,12	0,46	0,12	0,48	
	Endo III/IV	4	1,1	1,28	0,64	0,33	1,86	0,13	2,97	
hsa-miR-15a	Controle	5	0,28	0,23	0,17	0,17	0,34	0,06	0,64	0.1118
	Endo I/II	4	0,16	0,02	0,16	0,15	0,17	0,14	0,19	
	Endo III/IV	4	0,32	0,12	0,3	0,23	0,4	0,19	0,47	

hsa-miR-15b#	Controle	5	0,76	1,03	0,38	0,23	0,42	0,18	2,6	0.2915
	Endo I/II	5	0,18	0,18	0,1	0,05	0,32	0	0,41	
	Endo III/IV	4	0,49	0,53	0,36	0,17	0,82	0	1,24	
hsa-miR-15b	Controle	5	0,44	0,29	0,39	0,32	0,41	0,17	0,94	0.3136
	Endo I/II	5	0,2	0,07	0,23	0,2	0,24	0,09	0,26	
	Endo III/IV	5	0,3	0,18	0,24	0,2	0,47	0,08	0,51	
hsa-miR-16	Controle	5	0,5	0,54	0,3	0,2	0,37	0,17	1,44	0.2101
	Endo I/II	5	0,2	0,11	0,22	0,11	0,27	0,05	0,32	
	Endo III/IV	5	0,17	0,12	0,12	0,11	0,2	0,04	0,37	
hsa-miR-16-1#	Controle	5	0,92	0,69	0,66	0,47	1,44	0,2	1,83	0.6761
	Endo I/II	5	0,58	0,36	0,43	0,34	0,72	0,25	1,14	
	Endo III/IV	4	1,05	0,85	1,2	0,36	1,74	0	1,78	
hsa-miR-17#	Controle	5	0,67	0,36	0,6	0,49	0,85	0,23	1,17	0.2484
	Endo I/II	5	0,36	0,15	0,4	0,34	0,4	0,14	0,54	
	Endo III/IV	4	0,94	0,95	0,56	0,37	1,52	0,32	2,35	
hsa-miR-17	Controle	5	0,86	0,37	0,88	0,78	1,09	0,29	1,28	0.1249
	Endo I/II	5	0,54	0,26	0,65	0,4	0,71	0,16	0,79	

hsa-miR-181a	Endo III/IV	5	0,45	0,25	0,37	0,33	0,65	0,14	0,75	1
	Controle	5	0,7	0,59	0,64	0,49	0,67	0,06	1,66	
	Endo I/II	5	0,58	0,25	0,51	0,46	0,78	0,28	0,88	
	Endo III/IV	5	1,08	1,06	0,44	0,29	2,23	0,19	2,24	
hsa-miR-181a- 2#	Controle	5	1	0,94	0,7	0,44	0,99	0,26	2,62	0.1873
	Endo I/II	5	0,6	0,57	0,7	0,12	0,7	0,04	1,46	
	Endo III/IV	4	1,2	0,13	1,21	1,12	1,29	1,03	1,36	
	Controle	5	3,38	2,49	3,11	2,26	3,59	0,59	7,34	
hsa-miR-181c	Endo I/II	5	2,8	1,89	2,83	1,65	4,22	0,31	4,99	0.9704
	Endo III/IV	5	5,83	6,76	1,58	1,15	11,32	0,26	14,85	
	Controle	5	1,58	1,16	1,34	0,73	2,43	0,31	3,08	
	Endo I/II	5	1,14	0,77	0,76	0,63	1,7	0,44	2,21	
hsa-miR-182	Endo III/IV	5	1,21	1,82	0,77	0,04	0,82	0,01	4,4	0.7334
	Controle	5	2,33	0,87	2,71	1,7	2,72	1,18	3,33	
	Endo I/II	5	1,51	0,77	1,64	1,09	1,91	0,45	2,45	
	Endo III/IV	5	2,73	1,95	2,13	1,3	4,16	0,73	5,33	
hsa-miR-1825	Controle	5	1,79	1,29	1,91	0,55	2,47	0,53	3,53	0.3362
hsa-miR-183#	Controle	5	1,79	1,29	1,91	0,55	2,47	0,53	3,53	
	Controle	5	1,79	1,29	1,91	0,55	2,47	0,53	3,53	
	Controle	5	1,79	1,29	1,91	0,55	2,47	0,53	3,53	

hsa-miR-183	Endo I/II	4	1,21	0,78	1,46	0,69	1,72	0,09	1,83	0.3813
	Endo III/IV	4	1,58	0,64	1,89	1,25	1,9	0,62	1,91	
	Controle	5	1,34	0,63	1,3	1,04	1,41	0,64	2,34	
	Endo I/II	4	1,1	0,86	0,9	0,44	1,76	0,35	2,24	0.3625
	Endo III/IV	3	1,72	0,44	1,64	1,32	2,19	1,32	2,19	
hsa-miR-185	Controle	5	0,32	0,5	0,09	0,08	0,16	0,06	1,2	
	Endo I/II	5	0,04	0,04	0,03	0,01	0,05	0	0,11	0.09177
	Endo III/IV	4	0,06	0,04	0,05	0,03	0,09	0,03	0,11	
hsa-miR-186	Controle	5	0,84	0,45	0,79	0,42	1,26	0,39	1,35	
	Endo I/II	5	0,77	0,37	0,93	0,52	0,94	0,26	1,19	0.5655
	Endo III/IV	5	0,62	0,4	0,39	0,38	0,68	0,36	1,3	
	Controle	5	0,74	0,6	0,55	0,31	1,18	0,11	1,54	
hsa-miR-18a#	Endo I/II	5	0,41	0,17	0,52	0,24	0,53	0,23	0,55	0.744
	Endo III/IV	4	0,59	0,52	0,55	0,21	0,96	0,01	1,24	
	Controle	5	0,83	0,64	0,65	0,27	1,39	0,23	1,61	
hsa-miR-18a	Endo I/II	5	0,38	0,22	0,29	0,29	0,43	0,16	0,75	0.6771
	Endo III/IV	5	0,86	0,89	0,31	0,31	1,8	0,03	1,84	

hsa-miR-18b	Controle	5	2,66	2,47	1,33	0,79	5,16	0,5	5,54	0.3946
	Endo I/II	5	1,08	1,19	0,66	0,56	0,9	0,15	3,16	
	Endo III/IV	5	1,71	1,89	0,72	0,34	3,35	0,01	4,14	
hsa-miR-190	Controle	5	0,36	0,67	0,09	0,06	0,1	0,01	1,55	0.5258
	Endo I/II	5	0,04	0,05	0,02	0,02	0,03	0,01	0,14	
	Endo III/IV	4	0,14	0,17	0,08	0,02	0,26	0,02	0,38	
hsa-miR-190b	Controle	5	0,7	0,73	0,54	0,27	0,62	0,13	1,96	0.99
	Endo I/II	5	0,44	0,2	0,48	0,34	0,57	0,14	0,65	
	Endo III/IV	5	0,43	0,2	0,44	0,33	0,59	0,15	0,63	
hsa-miR-191#	Controle	5	2,12	1,15	2,13	1,6	3,18	0,47	3,22	0.744
	Endo I/II	5	1,95	1,01	1,92	1,52	2,04	0,76	3,52	
	Endo III/IV	4	1,68	0,81	1,55	1,11	2,26	0,87	2,78	
hsa-miR-191	Controle	5	0,61	0,39	0,41	0,34	0,98	0,25	1,07	0.1791
	Endo I/II	5	0,33	0,11	0,33	0,3	0,33	0,18	0,5	
	Endo III/IV	5	0,27	0,11	0,29	0,21	0,32	0,13	0,43	
hsa-miR-192#	Controle	5	1,06	0,86	0,87	0,35	1,36	0,32	2,39	0.2878
	Endo I/II	3	0,27	0,24	0,28	0,03	0,51	0,03	0,51	

hsa-miR-192	Endo III/IV	4	1,08	0,92	0,94	0,31	1,84	0,26	2,17	0.3791
	Controle	5	0,41	0,5	0,2	0,14	0,39	0,06	1,28	
	Endo I/II	5	0,19	0,09	0,19	0,18	0,23	0,06	0,31	
	Endo III/IV	5	0,13	0,06	0,12	0,11	0,12	0,07	0,23	
hsa-miR-193a- 5p	Controle	5	3,47	2,18	3,28	1,91	5,62	0,82	5,7	0.6561
	Endo I/II	5	2,34	1,72	2,39	1,21	2,72	0,44	4,94	
	Endo III/IV	4	2,89	1,51	2,84	1,71	4,07	1,21	4,67	
	Controle	5	0,89	0,44	0,78	0,76	0,93	0,4	1,59	
hsa-miR-193b#	Endo I/II	5	0,49	0,24	0,42	0,33	0,7	0,21	0,77	0.2276
	Endo III/IV	5	1,08	1,08	0,81	0,65	0,96	0,07	2,9	
	Controle	5	1,17	0,48	1,2	0,71	1,49	0,68	1,76	
	Endo I/II	5	1,28	0,66	1,14	1,07	1,9	0,35	1,93	
hsa-miR-193b	Endo III/IV	5	0,95	0,15	0,98	0,9	0,99	0,75	1,15	0.5655
	Controle	5	0,3	0,36	0,17	0,13	0,21	0,08	0,94	
	Endo I/II	5	0,12	0,09	0,1	0,06	0,14	0,04	0,26	
	Endo III/IV	5	0,11	0,06	0,11	0,06	0,16	0,06	0,19	
hsa-miR-194	Controle	5	1,29	0,52	1,37	0,97	1,6	0,61	1,93	0.3263
hsa-miR-195	Endo I/II	5	0,11	0,06	0,11	0,06	0,16	0,06	0,19	
	Endo III/IV	5	0,11	0,06	0,11	0,06	0,16	0,06	0,19	
	Controle	5	1,29	0,52	1,37	0,97	1,6	0,61	1,93	

hsa-miR-196b	Endo I/II	5	0,92	0,44	0,88	0,84	1,05	0,31	1,52	0.4025
	Endo III/IV	5	0,92	0,53	0,86	0,43	1,4	0,39	1,53	
	Controle	3	0,96	1,03	0,76	0,05	2,08	0,05	2,08	
	Endo I/II	3	32,72	56,6	0,07	0,02	98,08	0,02	98,08	0.8452
	Endo III/IV	4	0,55	0,57	0,4	0,12	0,99	0,09	1,32	
hsa-miR-197	Controle	5	0,66	0,26	0,62	0,51	0,65	0,43	1,11	
	Endo I/II	5	0,88	0,55	0,66	0,6	0,78	0,51	1,85	0.3314
	Endo III/IV	5	0,53	0,12	0,56	0,51	0,6	0,34	0,66	
hsa-miR-199a-3p	Controle	5	0,59	0,31	0,52	0,43	0,9	0,21	0,92	
	Endo I/II	5	2,53	4,55	0,46	0,21	1,38	0	10,62	0.7634
	Endo III/IV	5	0,49	0,37	0,41	0,32	0,81	0	0,91	
hsa-miR-19a	Controle	5	1,15	0,7	0,9	0,79	1,2	0,53	2,33	
	Endo I/II	5	0,6	0,28	0,62	0,34	0,74	0,31	0,98	0.1409
	Endo III/IV	5	0,54	0,3	0,49	0,39	0,6	0,2	1,01	
hsa-miR-19b	Controle	5	0,84	0,23	0,84	0,72	0,94	0,54	1,15	
	Endo I/II	5	0,59	0,48	0,37	0,37	0,6	0,22	1,41	0.1466
	Endo III/IV	5	0,51	0,16	0,52	0,46	0,54	0,3	0,73	

hsa-miR-19b-1#	Controle	5	1,05	0,47	0,85	0,81	1,33	0,53	1,71	0.8106
	Endo I/II	5	0,84	0,51	0,92	0,62	1,02	0,13	1,52	
	Endo III/IV	5	1,16	0,84	1,33	0,49	1,57	0,18	2,25	
hsa-miR-200a	Controle	5	0,43	0,35	0,28	0,18	0,64	0,11	0,95	0.9788
	Endo I/II	5	1,36	2,42	0,21	0,19	0,72	0,03	5,67	
	Endo III/IV	4	0,28	0,06	0,27	0,25	0,32	0,22	0,36	
hsa-miR-200b	Controle	5	0,95	0,5	0,98	0,66	1,05	0,36	1,71	0.6057
	Endo I/II	4	4,5	8,31	0,52	0,21	8,8	0,02	16,96	
	Endo III/IV	5	0,7	0,62	0,41	0,4	0,64	0,29	1,78	
hsa-miR-200c	Controle	5	0,86	0,23	0,7	0,7	1,05	0,69	1,17	0.5434
	Endo I/II	5	19,24	41,88	0,62	0,4	0,95	0,07	94,16	
	Endo III/IV	5	0,67	0,55	0,47	0,47	0,7	0,13	1,58	
hsa-miR-202#	Controle	5	1,6	1,21	1,19	1,18	2,47	0,05	3,13	0.5326
	Endo I/II	5	0,75	1,01	0,37	0,07	0,79	0,06	2,48	
	Endo III/IV	5	0,97	1	0,96	0,13	1,31	0	2,46	
hsa-miR-202	Controle	5	1,02	0,35	1,19	0,76	1,27	0,55	1,36	0.5655
	Endo I/II	5	1,1	0,54	1,3	0,86	1,45	0,28	1,62	

hsa-miR-203	Endo III/IV	5	0,82	0,7	0,64	0,33	0,99	0,19	1,94	0.5117
	Controle	5	0,5	0,28	0,43	0,32	0,62	0,22	0,93	
	Endo I/II	5	0,33	0,18	0,37	0,16	0,45	0,15	0,54	
hsa-miR-204	Endo III/IV	5	0,45	0,27	0,39	0,26	0,58	0,2	0,85	0.6907
	Controle	5	1	0,38	0,97	0,82	1,02	0,58	1,59	
	Endo I/II	5	1,28	1,22	0,74	0,62	1,6	0,19	3,26	
hsa-miR-205	Endo III/IV	5	0,68	0,41	0,68	0,55	1,05	0,07	1,06	0.3923
	Controle	5	0,1	0,15	0,03	0,01	0,09	0,01	0,37	
	Endo I/II	5	0,42	0,45	0,25	0,05	0,76	0,02	1,04	
hsa-miR-206	Endo III/IV	4	0,14	0,15	0,09	0,04	0,25	0,02	0,36	0.4819
	Controle	5	0,15	0,08	0,14	0,13	0,14	0,07	0,28	
	Endo I/II	5	1,78	3,05	0,67	0,17	0,85	0,03	7,2	
hsa-miR-20a#	Endo III/IV	5	0,4	0,47	0,23	0,05	0,49	0,05	1,18	0.4317
	Controle	5	1,19	0,87	1	0,76	1,42	0,23	2,55	
	Endo I/II	5	0,42	0,42	0,29	0,25	0,43	0	1,13	
hsa-miR-20a	Endo III/IV	5	1,07	1,19	1,11	0,14	1,13	0,01	2,97	
	Controle	5	0,52	0,46	0,45	0,24	0,61	0,05	1,25	

hsa-miR-20b	Endo I/II	5	0,29	0,13	0,34	0,26	0,38	0,09	0,41	0.7788
	Endo III/IV	5	0,34	0,21	0,28	0,27	0,49	0,07	0,59	
	Controle	5	2,1	1,02	1,55	1,54	2,77	1,1	3,55	
	Endo I/II	5	1,16	0,75	1,27	0,68	1,78	0,15	1,94	0.08982
	Endo III/IV	5	0,8	0,52	0,85	0,49	1,25	0,1	1,33	
hsa-miR-21#	Controle	5	0,83	0,43	0,55	0,52	1,27	0,48	1,32	
	Endo I/II	5	0,76	0,56	0,43	0,41	0,84	0,4	1,71	0.2982
	Endo III/IV	5	1,52	1,52	0,99	0,74	1,09	0,58	4,22	
hsa-miR-21	Controle	5	1,11	0,38	1,06	0,86	1,38	0,67	1,59	
	Endo I/II	5	0,86	0,3	0,9	0,87	1,05	0,37	1,12	0.7634
	Endo III/IV	5	2,18	2,39	0,66	0,53	3,78	0,32	5,6	
hsa-miR-210	Controle	5	0,81	0,24	0,76	0,73	0,81	0,54	1,21	
	Endo I/II	5	0,85	0,48	0,63	0,56	1,36	0,36	1,37	0.99
	Endo III/IV	5	0,75	0,45	0,94	0,63	0,94	0,04	1,21	
hsa-miR-212	Controle	5	0,49	0,29	0,62	0,28	0,66	0,09	0,79	
	Endo I/II	5	0,44	0,32	0,51	0,17	0,58	0,09	0,87	0.4431
	Endo III/IV	5	0,32	0,18	0,39	0,18	0,42	0,09	0,51	

hsa-miR-213	Controle	5	2,97	2,23	1,64	1,41	5,15	1	5,63	0.9364
	Endo I/II	4	3,52	4,88	1,54	0,85	6,19	0,22	10,77	
	Endo III/IV	5	4,72	4,45	2,83	1,06	9,43	0,68	9,61	
hsa-miR-214#	Controle	5	0,95	0,73	0,74	0,47	0,98	0,37	2,19	0.8287
	Endo I/II	4	1,61	2,24	0,74	0,12	3,1	0,1	4,86	
	Endo III/IV	4	0,54	0,39	0,48	0,27	0,82	0,15	1,07	
hsa-miR-214	Controle	5	1,11	0,64	1,09	0,89	1,42	0,2	1,94	0.2299
	Endo I/II	5	3,56	6,7	0,38	0,27	1,63	0,04	15,5	
	Endo III/IV	5	0,34	0,3	0,24	0,15	0,43	0,06	0,82	
hsa-miR-215	Controle	5	0,86	1,05	0,64	0,24	0,65	0,1	2,68	0.5945
	Endo I/II	5	0,28	0,11	0,28	0,23	0,39	0,13	0,39	
	Endo III/IV	5	0,32	0,12	0,33	0,32	0,35	0,12	0,47	
hsa-miR-218	Controle	5	0,45	0,31	0,25	0,21	0,75	0,19	0,81	0.03801
	Endo I/II	5	0,15	0,02	0,16	0,14	0,16	0,13	0,17	
	Endo III/IV	5	0,25	0,18	0,17	0,15	0,3	0,08	0,53	
hsa-miR-219-1-3p	Controle	3	2,97	1,48	2,35	1,89	4,66	1,89	4,66	0.7326
	Endo I/II	3	2,29	2,27	1,66	0,39	4,81	0,39	4,81	

hsa-miR-22#	Endo III/IV	3	5,29	4,75	3,69	1,54	10,63	1,54	10,63	0.5047
	Controle	5	0,92	0,46	1,03	0,91	1,23	0,15	1,28	
	Endo I/II	5	0,36	0,55	0,15	0,07	0,22	0,04	1,34	
	Endo III/IV	5	1,13	1,17	1,19	0,1	1,42	0,03	2,91	
hsa-miR-22	Controle	5	1,08	0,13	1,13	1,03	1,14	0,88	1,23	0.5223
	Endo I/II	4	1,23	0,99	1,09	0,54	1,92	0,19	2,56	
	Endo III/IV	4	1,64	1,26	1,75	0,87	2,42	0,01	3,07	
	Controle	5	0,96	0,81	0,48	0,43	1,14	0,43	2,3	
hsa-miR-221	Endo I/II	5	1,11	1,54	0,47	0,42	0,82	0	3,81	0.8933
	Endo III/IV	4	2,03	2,04	2	0,26	3,79	0,25	3,87	
	Controle	5	0,81	0,55	0,71	0,44	0,84	0,35	1,72	
	Endo I/II	5	1,19	0,92	1,07	0,66	1,81	0,04	2,38	
hsa-miR-222#	Endo III/IV	5	3,54	2,82	3,24	1,52	6,24	0,18	6,53	0.2491
	Controle	5	0,67	0,31	0,8	0,49	0,84	0,23	1,01	
	Endo I/II	5	0,71	0,41	0,6	0,53	0,6	0,41	1,44	
	Endo III/IV	5	0,52	0,44	0,32	0,3	0,6	0,13	1,24	
hsa-miR-223#	Controle	4	0,63	0,65	0,57	0,08	1,18	0,03	1,35	

hsa-miR-223	Endo I/II	4	0,3	0,3	0,27	0,05	0,56	0,05	0,63	0.7939
	Endo III/IV	4	0,37	0,17	0,4	0,24	0,5	0,16	0,51	
	Controle	5	0,66	0,46	0,54	0,43	0,95	0,09	1,28	
	Endo I/II	5	0,37	0,27	0,26	0,24	0,45	0,12	0,8	0.6126
	Endo III/IV	5	0,5	0,29	0,53	0,23	0,7	0,19	0,85	
hsa-miR-23a#	Controle	4	1,87	1,68	1,66	0,84	2,9	0,05	4,12	
	Endo I/II	4	0,97	1,63	0,23	0,11	1,83	0,02	3,41	0.7086
	Endo III/IV	5	1,69	2,05	1,53	0,06	1,76	0,03	5,07	
hsa-miR-23b	Controle	5	1,07	0,22	1	0,93	1,06	0,91	1,44	
	Endo I/II	5	1,69	2,38	0,78	0,56	1,16	0,06	5,88	0.6868
	Endo III/IV	4	5,8	6,72	4,11	0,54	11,06	0,41	14,57	
hsa-miR-24	Controle	5	0,86	0,34	1,09	0,55	1,11	0,42	1,11	
	Endo I/II	5	0,82	0,31	0,93	0,75	1,05	0,32	1,07	0.5047
	Endo III/IV	5	0,81	0,4	1,07	0,55	1,08	0,23	1,11	
hsa-miR-24-2#	Controle	5	1,4	1,16	0,79	0,6	2,31	0,33	2,96	
	Endo I/II	4	0,89	0,64	0,85	0,44	1,34	0,15	1,71	0.338
	Endo III/IV	3	3,4	3,13	1,64	1,56	7,01	1,56	7,01	

hsa-miR-25#	Controle	5	0,5	0,73	0,19	0,16	0,26	0,1	1,81	0.2309
	Endo I/II	5	0,25	0,18	0,21	0,17	0,22	0,1	0,56	
	Endo III/IV	4	0,77	0,69	0,54	0,35	1,18	0,21	1,77	
hsa-miR-25	Controle	5	0,27	0,34	0,12	0,12	0,17	0,06	0,87	0.3851
	Endo I/II	5	0,07	0,04	0,06	0,05	0,1	0,02	0,13	
	Endo III/IV	5	0,13	0,12	0,06	0,06	0,25	0	0,27	
hsa-miR-26a	Controle	5	0,81	0,47	0,99	0,7	1,01	0,07	1,3	0.3396
	Endo I/II	5	0,54	0,29	0,49	0,43	0,79	0,14	0,85	
	Endo III/IV	5	0,52	0,24	0,54	0,45	0,66	0,16	0,81	
hsa-miR-26a-1#	Controle	3	1,93	0,79	1,68	1,3	2,82	1,3	2,82	0.3126
	Endo I/II	4	6,3	6,84	3,46	2,49	10,12	1,8	16,49	
	Endo III/IV	4	2,56	1,76	2,9	1,14	3,99	0,37	4,08	
hsa-miR-26a-2#	Controle	4	1,59	1,44	1,06	0,75	2,43	0,53	3,72	0.5849
	Endo I/II	3	1,1	1,36	0,5	0,15	2,66	0,15	2,66	
	Endo III/IV	3	1,48	0,8	1,91	0,56	1,97	0,56	1,97	
hsa-miR-26b#	Controle	5	1,44	1,05	1,13	0,87	1,58	0,46	3,18	0.6907
	Endo I/II	5	1,44	1,07	1,27	0,79	1,72	0,32	3,1	

hsa-miR-26b	Endo III/IV	5	1,91	1,1	2,21	1,07	2,38	0,57	3,33	0.4025
	Controle	5	0,39	0,5	0,25	0,19	0,25	0,01	1,27	
	Endo I/II	5	0,12	0,07	0,14	0,07	0,16	0,03	0,19	
	Endo III/IV	5	0,14	0,15	0,09	0,06	0,19	0	0,37	
hsa-miR-27a#	Controle	5	0,92	0,78	0,55	0,47	0,84	0,46	2,3	0.09569
	Endo I/II	5	2,02	1,08	1,8	1,77	2,76	0,47	3,3	
	Endo III/IV	5	4,12	3,32	3,3	3,24	4,05	0,46	9,54	
	Controle	5	0,51	0,33	0,42	0,22	0,69	0,22	1	
hsa-miR-27a	Endo I/II	5	0,52	0,2	0,62	0,44	0,64	0,21	0,7	0.7554
	Endo III/IV	5	0,62	0,25	0,51	0,45	0,87	0,37	0,91	
	Controle	5	0,68	0,44	0,56	0,32	0,91	0,3	1,33	
	Endo I/II	5	0,67	0,4	0,78	0,54	0,85	0,06	1,14	
hsa-miR-27b#	Endo III/IV	4	0,97	0,56	0,89	0,5	1,44	0,48	1,61	0.7788
	Controle	5	0,47	0,17	0,53	0,3	0,57	0,29	0,66	
	Endo I/II	5	0,45	0,27	0,37	0,36	0,61	0,11	0,81	
	Endo III/IV	5	0,38	0,24	0,33	0,29	0,56	0,05	0,66	
hsa-miR-28	Controle	5	0,46	0,1	0,44	0,4	0,52	0,35	0,59	

hsa-miR-28-3p	Endo I/II	5	0,27	0,16	0,24	0,18	0,34	0,09	0,5	0.2645
	Endo III/IV	5	1,12	1,36	0,2	0,19	2,16	0,06	2,98	
	Controle	5	0,82	0,4	0,83	0,51	0,93	0,42	1,42	
	Endo I/II	5	0,78	0,38	0,93	0,44	0,94	0,33	1,25	0.827
	Endo III/IV	5	0,95	0,33	0,92	0,91	1,14	0,45	1,33	
hsa-miR-296	Controle	5	0,6	0,24	0,65	0,61	0,72	0,21	0,84	
	Endo I/II	5	0,78	0,3	0,91	0,57	0,95	0,38	1,1	0.5945
	Endo III/IV	5	0,75	0,5	0,84	0,31	0,98	0,2	1,41	
hsa-miR-299-5p	Controle	5	0,7	1,15	0,35	0,05	0,35	0,02	2,74	
	Endo I/II	5	0,18	0,15	0,18	0,07	0,27	0,02	0,39	0.7408
	Endo III/IV	4	0,63	0,87	0,29	0,06	1,2	0,04	1,91	
hsa-miR-29a#	Controle	5	1,29	0,9	1,17	0,92	1,4	0,26	2,71	
	Endo I/II	4	0,7	0,25	0,76	0,54	0,87	0,35	0,94	0.387
	Endo III/IV	4	1,12	0,99	1,01	0,46	1,78	0,04	2,43	
hsa-miR-29a	Controle	5	0,87	0,47	0,83	0,57	0,93	0,42	1,62	
	Endo I/II	5	0,76	0,38	0,88	0,51	0,93	0,25	1,21	0.9704
	Endo III/IV	5	0,78	0,29	0,8	0,59	0,92	0,43	1,17	

hsa-miR-29b	Controle	5	0,48	0,26	0,52	0,33	0,72	0,13	0,72	0.2645
	Endo I/II	5	0,39	0,24	0,37	0,23	0,51	0,11	0,72	
	Endo III/IV	5	0,25	0,22	0,13	0,1	0,34	0,08	0,59	
hsa-miR-29b-1#	Controle	5	2,07	1,39	1,68	1,32	2,75	0,52	4,09	0.3198
	Endo I/II	4	0,92	1,23	0,44	0,23	1,61	0,07	2,74	
	Endo III/IV	5	1,66	1,15	2,04	1,01	2,13	0,07	3,08	
hsa-miR-29c	Controle	5	4,76	2,75	5,54	4,98	5,68	0,12	7,47	0.7334
	Endo I/II	5	2,72	2,19	2,19	1,55	3,47	0,33	6,06	
	Endo III/IV	5	3,55	3,38	3,09	0,39	6,56	0,22	7,48	
hsa-miR-301	Controle	5	0,47	0,29	0,44	0,24	0,51	0,2	0,93	0.4025
	Endo I/II	5	0,22	0,11	0,26	0,17	0,27	0,07	0,34	
	Endo III/IV	5	0,24	0,2	0,26	0,16	0,27	0	0,54	
hsa-miR-301b	Controle	4	1,17	0,64	1,12	0,66	1,68	0,51	1,94	0.2103
	Endo I/II	5	1,74	0,53	2,05	1,39	2,06	0,98	2,22	
	Endo III/IV	4	1,14	0,41	1,18	0,79	1,49	0,7	1,5	
hsa-miR-302a	Controle	5	2,55	2,89	1,81	0,64	2,09	0,61	7,58	0.9253
	Endo I/II	5	13,51	19,09	1,69	0,35	21,93	0,17	43,44	

hsa-miR-302d	Endo III/IV	5	21,1	37,81	0,55	0,35	16,9	0,19	87,51	0.5455
	Controle	3	19,87	6,34	17,64	14,94	27,02	14,94	27,02	
	Endo I/II	3	20,66	23,63	9,04	5,1	47,85	5,1	47,85	
	Endo III/IV	5	19,25	29,37	5,72	3,46	15,86	0,45	70,76	
hsa-miR-30a-3p	Controle	5	0,82	0,27	0,9	0,82	0,92	0,36	1,09	0.3362
	Endo I/II	5	0,51	0,26	0,41	0,41	0,7	0,2	0,85	
	Endo III/IV	5	0,74	0,93	0,43	0,39	0,47	0,04	2,38	
	Controle	5	0,49	0,27	0,52	0,52	0,52	0,08	0,84	
hsa-miR-30a-5p	Endo I/II	5	0,14	0,17	0,07	0,06	0,14	0,02	0,44	0.1367
	Endo III/IV	5	0,3	0,47	0,12	0,09	0,15	0,01	1,15	
	Controle	5	0,62	0,22	0,56	0,55	0,82	0,33	0,86	
	Endo I/II	5	0,38	0,18	0,49	0,19	0,49	0,18	0,54	
hsa-miR-30b	Endo III/IV	5	0,22	0,09	0,24	0,18	0,27	0,09	0,34	0.02086
	Controle	5	0,37	0,19	0,35	0,33	0,43	0,1	0,63	
	Endo I/II	5	0,36	0,19	0,39	0,21	0,43	0,16	0,63	
	Endo III/IV	5	0,22	0,09	0,24	0,18	0,27	0,09	0,34	
hsa-miR-30c	Controle	5	1,48	0,84	1,08	0,96	2,22	0,61	2,54	0.2753
hsa-miR-30d#	Controle	5	1,48	0,84	1,08	0,96	2,22	0,61	2,54	

hsa-miR-30d	Endo I/II	5	1,01	0,94	0,51	0,51	1,7	0,06	2,3	0.4764
	Endo III/IV	4	1,11	0,85	0,87	0,57	1,65	0,37	2,33	
	Controle	5	0,63	0,37	0,6	0,58	0,72	0,11	1,14	
	Endo I/II	5	0,19	0,22	0,1	0,07	0,17	0,04	0,57	0.1367
	Endo III/IV	5	0,36	0,48	0,16	0,16	0,25	0,01	1,2	
hsa-miR-30e-3p	Controle	5	0,88	0,19	0,81	0,79	0,83	0,77	1,22	
	Endo I/II	5	0,57	0,3	0,61	0,39	0,79	0,16	0,89	0.1998
	Endo III/IV	5	0,78	0,77	0,59	0,54	0,61	0,06	2,1	
	Controle	5	1,43	1,24	1,27	0,51	1,71	0,27	3,38	
	Endo I/II	5	0,91	0,81	0,56	0,37	1,27	0,18	2,16	0.6907
hsa-miR-31#	Endo III/IV	5	1,55	1,34	0,83	0,76	2,64	0,2	3,3	
	Controle	5	1,37	0,99	1,53	0,59	1,56	0,34	2,84	
	Endo I/II	5	0,95	0,49	0,98	0,78	1,37	0,2	1,39	0.3791
	Endo III/IV	5	1,77	1,23	1,39	1,26	2,09	0,41	3,7	
	Controle	4	0,8	0,2	0,86	0,65	0,95	0,52	0,95	
hsa-miR-32	Endo I/II	3	0,28	0,29	0,18	0,05	0,6	0,05	0,6	0.05852
	Endo III/IV	5	0,22	0,21	0,2	0,11	0,24	0,01	0,56	

hsa-miR-320	Controle	5	1,01	0,6	0,91	0,88	0,95	0,33	1,99	0.3791
	Endo I/II	5	0,73	0,34	0,82	0,51	0,87	0,29	1,18	
	Endo III/IV	5	0,72	0,57	0,64	0,38	0,67	0,22	1,68	
hsa-miR-320B	Controle	5	0,64	0,18	0,59	0,55	0,74	0,42	0,88	0.1791
	Endo I/II	5	0,34	0,22	0,31	0,21	0,42	0,1	0,66	
	Endo III/IV	5	0,66	0,79	0,42	0,23	0,68	0	2	
hsa-miR-323-3p	Controle	5	2,8	4,9	0,84	0,43	1,05	0,12	11,54	0.5258
	Endo I/II	5	0,45	0,35	0,36	0,19	0,69	0,08	0,93	
	Endo III/IV	4	0,65	0,68	0,41	0,25	1,05	0,13	1,66	
hsa-miR-324-3p	Controle	5	1,55	0,53	1,7	1,27	1,9	0,77	2,08	0.3263
	Endo I/II	5	1,08	0,74	1,12	0,4	1,38	0,37	2,13	
	Endo III/IV	5	1,01	0,46	1,19	0,98	1,21	0,24	1,44	
hsa-miR-324-5p	Controle	5	0,58	0,43	0,42	0,35	0,6	0,24	1,31	0.3263
	Endo I/II	5	0,25	0,13	0,23	0,23	0,26	0,08	0,44	
	Endo III/IV	5	0,73	0,98	0,2	0,19	0,87	0	2,39	
hsa-miR-328	Controle	5	0,81	0,43	0,6	0,49	1,14	0,42	1,4	0.4724
	Endo I/II	5	0,86	0,57	0,76	0,52	0,92	0,31	1,8	

hsa-miR-329	Endo III/IV	5	0,56	0,31	0,49	0,32	0,86	0,23	0,91	0.617
	Controle	5	3,12	2,85	2,1	1,65	2,72	1,02	8,1	
	Endo I/II	4	1,82	1,06	2,08	1,04	2,61	0,38	2,75	
	Endo III/IV	5	2,25	2,28	1,01	0,97	2,17	0,88	6,21	
hsa-miR-330	Controle	5	1,38	1,46	0,79	0,7	1,39	0,17	3,87	0.7027
	Endo I/II	5	0,9	0,31	0,94	0,65	0,99	0,57	1,36	
	Endo III/IV	4	1,3	0,88	1,4	0,66	1,94	0,16	2,25	
	Controle	5	0,78	0,27	0,81	0,53	0,86	0,5	1,17	
hsa-miR-331	Endo I/II	5	0,88	0,52	0,65	0,47	1,29	0,42	1,56	0.7634
	Endo III/IV	5	0,71	0,41	0,51	0,43	1,12	0,31	1,17	
	Controle	5	2	1,1	1,79	1,14	3,06	0,78	3,21	
	Endo I/II	5	1,21	0,89	1,08	0,88	1,52	0,08	2,51	
hsa-miR-331- 5p	Endo III/IV	4	0,93	1,06	0,44	0,35	1,51	0,32	2,52	0.2141
	Controle	5	15,33	13,05	11,04	9,23	13,03	5,25	38,11	
	Endo I/II	4	14,4	8,75	14,03	6,84	21,95	6,75	22,78	
	Endo III/IV	3	16,99	16,01	9,76	5,87	35,35	5,87	35,35	
hsa-miR-335#	Controle	5	0,68	0,44	0,72	0,54	0,75	0,08	1,31	0.9949

hsa-miR-337-3p	Endo I/II	5	0,26	0,19	0,26	0,19	0,27	0,03	0,56	0.4208
	Endo III/IV	4	1,05	1,29	0,69	0,07	2,03	0,03	2,78	
	Controle	4	2,5	0,56	2,62	2,07	2,93	1,77	2,99	
	Endo I/II	4	2,99	1,05	2,81	2,24	3,74	1,95	4,4	0.2727
	Endo III/IV	3	4,97	3	3,71	2,8	8,39	2,8	8,39	
hsa-miR-337-5p	Controle	5	1,24	0,92	0,89	0,55	1,73	0,43	2,63	
	Endo I/II	4	2,28	2,4	1,29	0,83	3,72	0,69	5,83	0.4791
	Endo III/IV	3	0,76	0,61	0,84	0,12	1,33	0,12	1,33	
hsa-miR-338-5P	Controle	5	2,94	5	0,89	0,56	1,13	0,27	11,87	
	Endo I/II	5	2,23	1,28	1,77	1,57	2,1	1,24	4,45	0.2808
	Endo III/IV	5	1,51	1,38	1,02	0,55	2,06	0,26	3,66	
hsa-miR-339-3p	Controle	5	1,26	0,37	1,07	1,05	1,44	0,91	1,83	
	Endo I/II	5	0,89	0,7	0,43	0,41	1,24	0,41	1,98	0.4019
	Endo III/IV	5	0,95	0,66	0,84	0,77	0,93	0,22	2,02	
hsa-miR-339-5p	Controle	5	0,55	0,14	0,57	0,49	0,58	0,38	0,76	
	Endo I/II	5	0,54	0,39	0,65	0,25	0,8	0,04	0,98	1
	Endo III/IV	5	0,7	0,68	0,39	0,35	1	0,02	1,73	

hsa-miR-33a#	Controle	5	0,99	0,83	0,54	0,54	1,02	0,43	2,42	0.09253
	Endo I/II	4	0,29	0,19	0,3	0,13	0,46	0,12	0,46	
	Endo III/IV	4	1,23	1,13	0,96	0,52	1,95	0,18	2,84	
hsa-miR-33a	Controle	5	0,69	0,67	0,57	0,19	0,78	0,12	1,78	0.8731
	Endo I/II	5	0,57	0,52	0,35	0,14	1,11	0,11	1,15	
	Endo III/IV	4	0,42	0,32	0,43	0,22	0,63	0,03	0,81	
hsa-miR-340#	Controle	5	0,86	0,34	0,78	0,7	1,13	0,43	1,29	0.2521
	Endo I/II	4	0,65	0,31	0,66	0,38	0,92	0,35	0,93	
	Endo III/IV	4	1,18	0,59	1,01	0,83	1,53	0,66	2,04	
hsa-miR-340	Controle	5	1,31	0,47	1,3	0,99	1,31	0,87	2,08	0.06522
	Endo I/II	5	0,6	0,19	0,55	0,46	0,71	0,4	0,86	
	Endo III/IV	5	0,89	0,72	0,99	0,45	1,02	0,05	1,94	
hsa-miR-342-3p	Controle	5	2,16	2,77	1,03	0,78	1,25	0,64	7,1	0.2101
	Endo I/II	5	1,29	0,41	1,21	0,93	1,61	0,9	1,82	
	Endo III/IV	5	0,67	0,5	0,44	0,29	0,93	0,28	1,42	
hsa-miR-345	Controle	5	1,17	0,62	1,11	0,61	1,46	0,6	2,06	0.2299
	Endo I/II	5	1,01	0,26	1,06	0,83	1,23	0,66	1,28	

hsa-miR-34a#	Endo III/IV	5	0,68	0,33	0,78	0,37	0,93	0,3	1,01	0.827
	Controle	5	1,58	1,27	0,96	0,73	1,8	0,7	3,7	
	Endo I/II	5	1,11	0,95	0,94	0,46	1,33	0,19	2,61	
	Endo III/IV	5	1,66	1,55	1,04	0,84	2,25	0,11	4,06	
hsa-miR-34a	Controle	5	0,77	0,64	0,64	0,46	0,65	0,24	1,88	0.5945
	Endo I/II	5	0,97	0,55	1,19	0,39	1,29	0,38	1,59	
	Endo III/IV	5	1,89	1,61	1,33	0,62	3,49	0,29	3,71	
	Controle	5	0,72	0,26	0,78	0,66	0,87	0,3	0,98	
hsa-miR-34b- 3p	Endo I/II	5	1,63	1,85	0,83	0,63	1,76	0,16	4,78	0.8946
	Endo III/IV	4	0,82	0,36	0,71	0,55	1,09	0,54	1,31	
	Controle	5	2,2	2,67	1,47	0,97	1,61	0,1	6,87	
	Endo I/II	3	3,31	4,57	1,17	0,19	8,56	0,19	8,56	
hsa-miR-34b- 5p	Endo III/IV	3	1,34	0,69	1,12	0,78	2,12	0,78	2,12	0.9702
	Controle	5	0,82	0,89	0,59	0,2	0,83	0,16	2,35	
	Endo I/II	4	0,77	0,09	0,76	0,7	0,83	0,68	0,87	
	Endo III/IV	4	0,82	0,87	0,83	0,08	1,57	0,01	1,64	
hsa-miR-34c	Controle	5	0,83	0,61	0,89	0,4	0,99	0,16	1,73	0.8925
hsa-miR-361	Controle	5	0,83	0,61	0,89	0,4	0,99	0,16	1,73	

hsa-miR-361-3p	Endo I/II	5	0,96	0,63	1,01	0,7	1,13	0,11	1,83	0.8869
	Endo III/IV	5	0,99	0,73	0,87	0,45	1,33	0,24	2,06	
	Controle	5	1,59	0,84	1,46	1,38	1,98	0,41	2,7	
	Endo I/II	4	43,64	84,3	2,12	0,46	86,82	0,26	170,06	0.9549
	Endo III/IV	3	4,25	5,2	1,39	1,12	10,26	1,12	10,26	
hsa-miR-362	Controle	5	1,05	0,49	1,16	0,67	1,17	0,51	1,74	
	Endo I/II	5	0,9	0,6	0,92	0,9	1,01	0,01	1,69	0.7334
	Endo III/IV	5	0,81	0,51	0,89	0,61	1,14	0,05	1,39	
hsa-miR-362-3p	Controle	5	1,9	1,17	1,97	1	2,31	0,63	3,6	
	Endo I/II	4	0,75	0,69	0,53	0,23	1,26	0,23	1,7	0.02451
	Endo III/IV	4	4,85	3,06	4,06	2,79	6,91	2,12	9,16	
hsa-miR-363	Controle	4	0,33	0,55	0,08	0,03	0,63	0	1,15	
	Endo I/II	4	0,03	0,03	0,02	0	0,05	0	0,05	0.3749
	Endo III/IV	3	0,21	0,31	0,06	0	0,56	0	0,56	
hsa-miR-365	Controle	5	1,15	1,59	0,53	0,33	0,62	0,3	3,98	
	Endo I/II	5	0,86	0,49	0,84	0,69	1,21	0,15	1,41	0.9324
	Endo III/IV	5	0,76	0,69	0,33	0,23	1,5	0,2	1,51	

hsa-miR-370	Controle	5	0,93	0,3	0,87	0,73	1,08	0,61	1,37	0.2209
	Endo I/II	5	0,51	0,41	0,24	0,22	0,89	0,17	1,02	
	Endo III/IV	5	0,54	0,49	0,37	0,29	0,4	0,22	1,41	
hsa-miR-373	Controle	5	1,23	1,65	0,4	0,34	1,11	0,19	4,11	0.5945
	Endo I/II	5	3,43	6,87	0,44	0,22	0,72	0,04	15,71	
	Endo III/IV	5	0,37	0,35	0,3	0,08	0,66	0,02	0,79	
hsa-miR-374	Controle	5	0,46	0,46	0,35	0,29	0,37	0,04	1,25	0.2299
	Endo I/II	5	0,14	0,09	0,12	0,1	0,19	0,03	0,26	
	Endo III/IV	5	0,24	0,27	0,16	0,05	0,28	0,04	0,7	
hsa-miR-375	Controle	5	0,5	0,4	0,66	0,11	0,77	0,04	0,92	0.6496
	Endo I/II	5	0,32	0,24	0,21	0,13	0,46	0,12	0,67	
	Endo III/IV	4	0,24	0,23	0,21	0,1	0,38	0	0,56	
hsa-miR-376a#	Controle	4	2,05	1,79	1,79	0,68	3,43	0,28	4,35	0.1353
	Endo I/II	3	0,76	0,21	0,76	0,55	0,97	0,55	0,97	
	Endo III/IV	2	4,48	2,74	4,48	2,55	6,42	2,55	6,42	
hsa-miR-376a	Controle	5	0,69	0,27	0,59	0,58	0,69	0,43	1,15	0.3396
	Endo I/II	5	0,43	0,32	0,24	0,22	0,74	0,13	0,8	

hsa-miR-376c	Endo III/IV	5	0,44	0,18	0,53	0,26	0,54	0,24	0,64	0.5117
	Controle	5	0,77	0,43	0,73	0,65	1,04	0,15	1,28	
	Endo I/II	5	0,51	0,4	0,32	0,24	0,89	0,1	0,97	
hsa-miR-378a- 5p	Endo III/IV	5	0,62	0,44	0,32	0,32	1,01	0,28	1,19	0.8267
	Controle	5	0,47	0,13	0,39	0,39	0,52	0,37	0,68	
	Endo I/II	5	0,57	0,32	0,69	0,29	0,83	0,17	0,88	
hsa-miR-378	Endo III/IV	5	0,54	0,27	0,46	0,41	0,63	0,23	0,96	0.7558
	Controle	5	1,24	0,89	1,08	0,99	1,39	0,15	2,61	
	Endo I/II	5	1,04	0,26	1,09	1,04	1,18	0,59	1,28	
hsa-miR-380- 5p	Endo III/IV	5	1,56	0,91	1,53	0,92	2,05	0,51	2,8	0.4791
	Controle	5	3,94	1,04	4,05	3,96	4,52	2,22	4,93	
	Endo I/II	4	3,62	2,84	3,59	1,77	5,47	0,18	7,12	
hsa-miR-381	Endo III/IV	3	10,4	10,53	8,2	1,14	21,86	1,14	21,86	0.9458
	Controle	5	0,41	0,52	0,21	0,04	0,49	0,01	1,27	
	Endo I/II	5	0,38	0,46	0,08	0,08	0,71	0,01	1,02	
hsa-miR-382	Endo III/IV	4	0,36	0,38	0,35	0,03	0,69	0,01	0,74	
	Controle	5	0,54	0,3	0,52	0,44	0,6	0,15	0,98	

hsa-miR-409-3p	Endo I/II	5	0,3	0,18	0,27	0,24	0,42	0,04	0,51	0.3621
	Endo III/IV	4	0,4	0,28	0,3	0,21	0,59	0,2	0,79	
	Controle	5	0,21	0,24	0,1	0,09	0,19	0,06	0,63	
	Endo I/II	5	0,16	0,09	0,14	0,1	0,2	0,08	0,3	0.8845
	Endo III/IV	5	0,15	0,12	0,14	0,08	0,14	0,04	0,34	
hsa-miR-410	Controle	5	0,64	0,25	0,74	0,4	0,84	0,33	0,88	
	Endo I/II	5	0,52	0,27	0,56	0,47	0,69	0,08	0,79	0.9311
	Endo III/IV	4	0,62	0,35	0,47	0,42	0,83	0,41	1,14	
hsa-miR-411#	Controle	5	0,75	0,4	0,62	0,59	0,81	0,35	1,41	
	Endo I/II	4	0,57	0,56	0,41	0,15	0,99	0,12	1,32	0.3007
	Endo III/IV	4	1,23	0,67	1,29	0,66	1,81	0,54	1,82	
hsa-miR-411	Controle	5	0,55	0,36	0,65	0,28	0,85	0,09	0,9	
	Endo I/II	5	0,38	0,35	0,21	0,2	0,67	0	0,82	0.6126
	Endo III/IV	5	0,41	0,45	0,16	0,14	0,49	0,09	1,16	
hsa-miR-422a	Controle	4	0,73	0,51	0,68	0,35	1,12	0,18	1,39	
	Endo I/II	4	0,63	0,48	0,59	0,29	0,96	0,09	1,25	0.5336
	Endo III/IV	5	2,36	3,07	0,78	0,66	2,56	0,18	7,6	

hsa-miR-423-5p	Controle	5	1,08	0,32	1,22	1	1,23	0,56	1,38	0.2369
	Endo I/II	5	0,48	0,4	0,35	0,16	0,74	0,13	1,04	
	Endo III/IV	5	1,9	2,36	0,36	0,3	3,54	0,06	5,25	
hsa-miR-424#	Controle	5	1,01	0,44	0,89	0,78	1,01	0,63	1,75	0.2753
	Endo I/II	5	0,6	0,84	0,26	0,18	0,4	0,07	2,08	
	Endo III/IV	5	1	0,83	0,92	0,43	1,3	0,12	2,25	
hsa-miR-424	Controle	5	0,89	0,56	0,73	0,64	1,41	0,18	1,49	0.8781
	Endo I/II	5	0,67	0,24	0,67	0,62	0,7	0,35	1,03	
	Endo III/IV	5	1,58	1,57	0,49	0,45	3,01	0,37	3,56	
hsa-miR-425#	Controle	5	1	0,55	0,91	0,88	1,33	0,2	1,67	0.8353
	Endo I/II	5	0,87	0,63	0,73	0,71	1,13	0,04	1,74	
	Endo III/IV	4	0,99	0,57	1,17	0,62	1,35	0,16	1,45	
hsa-miR-425-5p	Controle	5	0,44	0,23	0,36	0,32	0,47	0,22	0,83	0.1409
	Endo I/II	5	0,26	0,15	0,2	0,16	0,3	0,13	0,51	
	Endo III/IV	5	0,22	0,22	0,21	0,08	0,22	0	0,58	
hsa-miR-431	Controle	4	5,7	5,19	4,65	2,11	9,29	0,66	12,83	0.115
	Endo I/II	4	0,86	0,58	0,98	0,48	1,24	0,05	1,43	

hsa-miR-450b-5p	Endo I/II	5	0,68	0,57	0,76	0,16	0,88	0,1	1,48	0.8521
	Endo III/IV	5	0,55	0,39	0,48	0,42	0,67	0,06	1,12	
hsa-miR-454#	Controle	4	1,4	1,02	1,15	0,78	2,03	0,45	2,85	0.7939
	Endo I/II	4	1	0,86	1	0,26	1,74	0,25	1,75	
hsa-miR-454	Endo III/IV	4	1,58	1,63	1,27	0,31	2,85	0,09	3,7	0.1959
	Controle	5	0,48	0,44	0,33	0,24	0,48	0,12	1,24	
	Endo I/II	5	0,25	0,08	0,26	0,24	0,29	0,13	0,34	
	Endo III/IV	5	0,17	0,11	0,12	0,09	0,25	0,08	0,32	
hsa-miR-455	Controle	5	1,32	0,72	1,44	1,11	1,49	0,29	2,29	0.6126
	Endo I/II	5	0,91	0,56	0,74	0,53	1,47	0,29	1,52	
	Endo III/IV	5	2,01	1,68	2,88	0,33	2,92	0,1	3,83	
	Controle	5	0,62	0,26	0,76	0,38	0,81	0,3	0,86	
hsa-miR-455-3p	Endo I/II	5	0,67	0,84	0,36	0,22	0,44	0,17	2,15	0.4604
	Endo III/IV	4	1,86	1,79	1,66	0,42	3,29	0,05	4,04	
hsa-miR-483-3p	Controle	5	0,4	0,44	0,32	0,06	0,43	0,04	1,13	0.8106
	Endo I/II	5	0,35	0,26	0,24	0,17	0,62	0,07	0,63	
	Endo III/IV	5	0,25	0,26	0,13	0,11	0,29	0,03	0,68	

hsa-miR-483-5p	Controle	5	0,39	0,37	0,36	0,15	0,4	0,03	0,99	0.6188
	Endo I/II	5	0,17	0,16	0,1	0,08	0,24	0,04	0,42	
	Endo III/IV	5	0,17	0,13	0,11	0,09	0,18	0,06	0,39	
hsa-miR-484	Controle	5	0,53	0,2	0,44	0,44	0,59	0,35	0,85	0.2645
	Endo I/II	5	0,47	0,19	0,48	0,28	0,64	0,27	0,67	
	Endo III/IV	5	0,35	0,27	0,2	0,18	0,41	0,16	0,78	
hsa-miR-485-3p	Controle	5	2,58	1,1	2,51	2,42	2,63	1,11	4,22	0.3396
	Endo I/II	5	2,76	2,12	2,99	1,29	3,43	0,3	5,8	
	Endo III/IV	5	1,5	1,59	1,02	0,81	1,42	0,05	4,2	
hsa-miR-487a	Controle	5	0,4	0,15	0,39	0,3	0,4	0,26	0,65	0.3757
	Endo I/II	4	0,64	0,34	0,52	0,43	0,86	0,4	1,15	
	Endo III/IV	4	0,79	0,75	0,64	0,34	1,24	0,05	1,83	
hsa-miR-487b	Controle	5	1,65	1,42	1,49	0,62	1,63	0,48	4,02	0.8781
	Endo I/II	5	1,16	0,87	1,02	0,71	1,38	0,2	2,51	
	Endo III/IV	5	1,75	1,87	1,44	0,55	1,89	0,03	4,82	
hsa-miR-489	Controle	4	0,34	0,21	0,35	0,17	0,52	0,14	0,53	0.3157
	Endo I/II	5	0,27	0,17	0,23	0,13	0,37	0,11	0,51	

hsa-miR-502-3p	Endo I/II	4	0,61	0,36	0,73	0,36	0,87	0,11	0,89	0.3284
	Endo III/IV	3	1,59	0,39	1,42	1,32	2,03	1,32	2,03	
	Controle	5	1,57	0,76	1,57	1,45	1,8	0,45	2,58	
	Endo I/II	5	0,37	0,2	0,32	0,26	0,52	0,14	0,64	0.1429
	Endo III/IV	4	1,96	2,36	1,19	0,31	3,61	0,17	5,31	
hsa-miR-503	Controle	5	1	0,98	0,72	0,47	0,8	0,3	2,71	
	Endo I/II	5	0,37	0,2	0,32	0,26	0,52	0,14	0,64	0.09943
	Endo III/IV	4	1,16	1,05	0,79	0,56	1,76	0,36	2,71	
hsa-miR-505#	Controle	5	0,71	0,69	0,46	0,39	0,68	0,15	1,9	
	Endo I/II	5	0,31	0,23	0,27	0,11	0,51	0,08	0,59	0.3263
	Endo III/IV	5	0,32	0,35	0,29	0,08	0,3	0,03	0,91	
hsa-miR-505	Controle	5	0,3	0,12	0,29	0,26	0,39	0,12	0,45	
	Endo I/II	5	0,33	0,25	0,23	0,23	0,29	0,15	0,77	0.6443
	Endo III/IV	3	0,9	0,76	1,31	0,02	1,37	0,02	1,37	
hsa-miR-506	Controle	5	1,7	1,3	1,69	0,84	1,77	0,44	3,79	
	Endo I/II	5	1,71	1,78	0,69	0,3	3,28	0,28	3,99	0.7558
	Endo III/IV	5	1,12	0,74	0,93	0,73	1,15	0,42	2,36	

hsa-miR-508	Controle	5	1,54	0,79	1,85	1,08	2,1	0,37	2,28	0.2894
	Endo I/II	5	1	0,88	0,71	0,32	1,38	0,25	2,37	
	Endo III/IV	5	0,68	0,45	0,63	0,51	0,84	0,1	1,32	
hsa-miR-508-5p	Controle	5	2,07	2,93	0,52	0,38	1,94	0,32	7,17	0.6009
	Endo I/II	4	1,65	1,85	1,32	0,15	3,16	0,05	3,92	
	Endo III/IV	4	2,13	1,89	1,78	0,61	3,65	0,45	4,5	
hsa-miR-509-3-5p	Controle	5	2,45	1,97	2,63	0,71	3,25	0,43	5,23	0.4046
	Endo I/II	4	2,04	2,91	0,98	0,05	4,04	0,01	6,21	
	Endo III/IV	4	1,12	1,26	0,97	0,05	2,19	0,04	2,49	
hsa-miR-509-5p	Controle	5	1,42	1,01	1,24	0,56	2,13	0,41	2,76	0.4538
	Endo I/II	5	1,19	1,1	0,76	0,67	1,37	0,16	3,01	
	Endo III/IV	5	0,59	0,29	0,68	0,37	0,7	0,24	0,97	
hsa-miR-510	Controle	5	2,35	1,58	3,25	0,74	3,37	0,53	3,84	0.2808
	Endo I/II	5	1,33	1,48	0,49	0,36	2,37	0,03	3,41	
	Endo III/IV	5	1,35	1,01	1,61	0,47	2,1	0,12	2,43	
hsa-miR-513B	Controle	5	8,24	10,09	5,48	3,26	5,7	0,79	25,94	0.5325
	Endo I/II	3	3,1	3,23	2,2	0,43	6,69	0,43	6,69	

hsa-miR-532-5p	Endo I/II	5	0,28	0,23	0,28	0,07	0,51	0,03	0,51	0.06266
	Endo III/IV	5	0,58	0,24	0,55	0,49	0,65	0,27	0,92	
hsa-miR-532-3p	Controle	5	1,96	1,51	1,27	1,25	1,85	0,86	4,59	0.01216
	Endo I/II	5	1,24	0,24	1,16	1,14	1,48	0,93	1,49	
	Endo III/IV	5	0,21	0,26	0,11	0,02	0,34	0	0,61	
hsa-miR-539	Controle	5	1,17	0,52	1,38	0,77	1,55	0,48	1,65	0.5945
	Endo I/II	5	0,84	0,5	1,04	0,68	1,07	0,06	1,36	
	Endo III/IV	5	0,91	0,56	0,81	0,65	1,12	0,25	1,75	
hsa-miR-542-3p	Controle	5	0,74	0,5	0,77	0,35	0,9	0,21	1,47	0.875
	Endo I/II	4	0,51	0,24	0,52	0,31	0,71	0,25	0,76	
	Endo III/IV	4	0,98	1,1	0,65	0,18	1,79	0,13	2,51	
hsa-miR-542-5p	Controle	5	1,16	0,73	0,94	0,93	1,71	0,18	2,05	0.3923
	Endo I/II	5	0,5	0,39	0,36	0,26	0,79	0,06	1,01	
	Endo III/IV	4	0,86	0,67	0,71	0,45	1,27	0,21	1,81	
hsa-miR-543	Controle	5	1,09	0,45	1,23	0,68	1,35	0,59	1,63	0.1243
	Endo I/II	4	0,46	0,21	0,49	0,31	0,61	0,18	0,69	
	Endo III/IV	4	1,35	0,83	1,46	0,84	1,87	0,25	2,25	

hsa-miR-548a	Controle	5	0,87	1,23	0,37	0,22	0,73	0,02	3,02	0.6188
	Endo I/II	5	7,23	13,78	0,81	0,42	2,88	0,21	31,81	
	Endo III/IV	5	13,4	20,33	3,9	0,07	14,95	0,01	48,09	
hsa-miR-548b-5p	Controle	5	0,46	0,27	0,49	0,37	0,5	0,09	0,84	0.1863
	Endo I/II	5	0,18	0,16	0,11	0,09	0,15	0,09	0,47	
	Endo III/IV	3	0,16	0,14	0,24	0	0,25	0	0,25	
hsa-miR-548c	Controle	4	0,43	0,4	0,38	0,15	0,71	0,01	0,95	0.3007
	Endo I/II	5	9,97	19,62	0,73	0,35	3,54	0,27	44,98	
	Endo III/IV	4	25,94	36,67	12,08	2,16	49,71	0,17	79,41	
hsa-miR-548c-5p	Controle	5	2,11	2,79	0,86	0,47	2,12	0,18	6,92	0.255
	Endo I/II	4	0,33	0,31	0,26	0,09	0,57	0,07	0,74	
	Endo III/IV	4	1,39	1,53	1,03	0,2	2,57	0,09	3,4	
hsa-miR-548d-5p	Controle	5	0,79	0,43	0,66	0,55	1,11	0,29	1,35	0.07504
	Endo I/II	4	0,2	0,19	0,15	0,04	0,35	0,04	0,45	
	Endo III/IV	3	0,48	0,45	0,43	0,06	0,96	0,06	0,96	
hsa-miR-550a-3p	Controle	5	1,12	0,92	1,12	0,28	1,71	0,17	2,3	0.6601
	Endo I/II	4	1,77	1,89	1,2	0,46	3,08	0,24	4,44	

hsa-miR-574-3p	Endo I/II	5	1,26	0,32	1,26	0,96	1,48	0,93	1,67	0.4449
	Endo III/IV	5	0,92	0,44	0,77	0,65	0,97	0,56	1,65	
hsa-miR-575	Controle	3	1,08	1,18	0,62	0,2	2,42	0,2	2,42	0.2314
	Endo I/II	4	0,57	0,43	0,45	0,24	0,9	0,23	1,14	
	Endo III/IV	3	0,18	0,09	0,18	0,09	0,27	0,09	0,27	
hsa-miR-576-3p	Controle	5	1,41	0,63	1,54	0,81	1,84	0,74	2,15	0.7086
	Endo I/II	4	1,2	0,56	1,02	0,8	1,61	0,77	1,99	
	Endo III/IV	4	1,88	1,41	1,79	0,82	2,95	0,33	3,63	
hsa-miR-576-5p	Controle	4	1,2	0,88	1,31	0,57	1,82	0,04	2,12	0.6951
	Endo I/II	4	1,6	0,27	1,54	1,44	1,76	1,34	1,98	
	Endo III/IV	3	2,99	3,29	1,44	0,77	6,76	0,77	6,76	
hsa-miR-579	Controle	5	0,69	0,53	0,75	0,24	1,19	0,06	1,22	0.177
	Endo I/II	5	0,9	0,87	0,65	0,44	1,05	0,04	2,32	
	Endo III/IV	3	2,13	1,03	2,22	1,05	3,12	1,05	3,12	
hsa-miR-581	Controle	5	12,73	23,5	0,51	0,26	8,41	0,2	54,31	0.4821
	Endo I/II	5	0,7	0,31	0,63	0,59	0,89	0,28	1,1	
	Endo III/IV	3	0,49	0,5	0,21	0,19	1,06	0,19	1,06	

hsa-miR-582-3p	Controle	4	5,04	4,31	4,36	1,52	8,56	1,15	10,27	0.6889
	Endo I/II	3	1,61	0,2	1,52	1,48	1,84	1,48	1,84	
	Endo III/IV	3	50,98	86,79	1,17	0,58	151,19	0,58	151,19	
hsa-miR-584	Controle	3	17,02	11,45	12,96	8,14	29,95	8,14	29,95	0.3442
	Endo I/II	5	10,24	11,57	3,06	2,36	17,12	1,28	27,39	
	Endo III/IV	3	6,7	5,18	6,92	1,42	11,77	1,42	11,77	
hsa-miR-586	Controle	3	6,94	6,49	3,65	2,75	14,42	2,75	14,42	0.3625
	Endo I/II	5	15,47	13,72	12,25	5,73	20,32	2,32	36,72	
	Endo III/IV	4	35,66	43,51	17,19	9	62,31	8,28	99,96	
hsa-miR-590-3P	Controle	5	1,23	0,72	1,27	1	1,43	0,23	2,23	0.5434
	Endo I/II	5	0,86	0,55	0,88	0,72	0,97	0,11	1,64	
	Endo III/IV	5	1,08	1,04	0,77	0,51	1,26	0,08	2,78	
hsa-miR-590-5p	Controle	5	1,25	0,81	1,56	0,83	1,84	0,04	2	0.357
	Endo I/II	5	0,56	0,31	0,49	0,37	0,79	0,21	0,96	
	Endo III/IV	5	0,75	0,58	0,48	0,39	0,99	0,24	1,66	
hsa-miR-592	Controle	5	1,01	0,64	0,76	0,47	1,46	0,47	1,88	0.2341
	Endo I/II	4	1,09	0,89	0,82	0,54	1,65	0,35	2,38	

hsa-miR-597	Endo III/IV	4	1,72	0,68	1,79	1,19	2,26	0,9	2,42	0.6771
	Controle	5	0,37	0,26	0,37	0,3	0,45	0,01	0,71	
	Endo I/II	5	0,31	0,2	0,31	0,19	0,37	0,08	0,6	
	Endo III/IV	5	0,65	0,55	0,46	0,19	1,15	0,12	1,31	
hsa-miR-598	Controle	5	1,49	0,63	1,54	0,94	1,66	0,87	2,42	0.1142
	Endo I/II	5	0,72	0,46	0,8	0,51	1	0,06	1,25	
	Endo III/IV	5	0,65	0,55	0,46	0,19	1,15	0,12	1,31	
	Controle	5	0,56	0,24	0,49	0,44	0,64	0,29	0,92	
hsa-miR-601	Endo I/II	5	0,79	0,68	0,61	0,35	0,67	0,34	1,97	0.8106
	Endo III/IV	5	1,15	1,04	1,04	0,31	1,61	0,14	2,68	
	Controle	4	1,35	0,46	1,43	1,06	1,65	0,73	1,82	
	Endo I/II	4	1,64	0,79	2	1,22	2,06	0,46	2,11	
hsa-miR-616	Endo III/IV	3	2,54	1,72	1,7	1,41	4,52	1,41	4,52	0.4169
	Controle	4	0,02	0,03	0,01	0	0,04	0	0,06	
	Endo I/II	4	4,79	9,41	0,14	0	9,59	0	18,9	
	Endo III/IV	5	18,66	41,69	0	0	0,05	0	93,24	
hsa-miR-623	Controle	5	2,64	3,07	1,22	0,74	2,96	0,42	7,85	

hsa-miR-625#	Endo I/II	5	19,79	30,3	6,96	2,42	14,94	1,49	73,16	0.1466
	Endo III/IV	5	24,68	38,48	11,28	1,45	16,7	1,44	92,51	
	Controle	5	13067,71	29219,22	0,58	0,27	0,93	0,14	65336,63	
	Endo I/II	5	0,47	0,31	0,29	0,29	0,57	0,24	0,98	0.1809
	Endo III/IV	5	0,22	0,12	0,25	0,18	0,27	0,05	0,37	
hsa-miR-625	Controle	5	3,24	1,77	3,78	1,66	4,42	1,12	5,21	
	Endo I/II	3	0,84	0,32	0,95	0,48	1,1	0,48	1,1	0.07038
	Endo III/IV	4	1,58	0,93	1,8	0,87	2,29	0,35	2,38	
hsa-miR-628- 3p	Controle	5	0,71	0,68	0,25	0,24	1,43	0,17	1,49	
	Endo I/II	5	0,48	0,23	0,46	0,36	0,56	0,2	0,81	0.8781
	Endo III/IV	5	0,62	0,34	0,6	0,36	0,82	0,24	1,08	
hsa-miR-628- 5p	Controle	5	0,43	0,36	0,35	0,17	0,48	0,14	1,03	
	Endo I/II	5	0,32	0,19	0,25	0,19	0,44	0,13	0,61	0.8521
	Endo III/IV	5	0,76	0,87	0,6	0,15	0,7	0,12	2,24	
hsa-miR-629- 3p	Controle	5	1,09	0,62	0,88	0,61	1,38	0,57	2,03	
	Endo I/II	5	1,06	0,93	0,94	0,54	1,24	0,05	2,51	0.7788
	Endo III/IV	5	0,71	0,49	0,61	0,57	0,95	0,05	1,38	

hsa-miR-629-5p	Controle	5	2,22	0,83	1,95	1,56	3,04	1,39	3,18	0.01723
	Endo I/II	4	0,74	0,5	0,79	0,36	1,12	0,11	1,27	
	Endo III/IV	3	0,68	0,34	0,52	0,47	1,07	0,47	1,07	
hsa-miR-636	Controle	5	0,95	0,59	0,77	0,54	1,15	0,42	1,87	0.07609
	Endo I/II	5	1,34	1,7	0,43	0,2	1,83	0,13	4,12	
	Endo III/IV	3	0,14	0,09	0,09	0,08	0,25	0,08	0,25	
hsa-miR-638	Controle	5	0,46	0,11	0,43	0,42	0,54	0,3	0,59	0.07609
	Endo I/II	5	0,62	0,98	0,25	0,15	0,25	0,1	2,37	
	Endo III/IV	5	0,21	0,16	0,14	0,11	0,25	0,09	0,49	
hsa-miR-639	Controle	5	0,27	0,2	0,28	0,11	0,38	0,05	0,55	0.1343
	Endo I/II	3	0,03	0,04	0,02	0	0,08	0	0,08	
	Endo III/IV	4	0,24	0,31	0,11	0,06	0,42	0,05	0,7	
hsa-miR-645	Controle	5	6,66	3,71	6,46	4,78	7,49	2,27	12,28	0.1075
	Endo I/II	5	9,41	8,08	7,74	5,62	9,17	1,58	22,94	
	Endo III/IV	5	2,66	3,53	0,97	0,89	1,68	0,8	8,94	
hsa-miR-652	Controle	5	0,48	0,62	0,24	0,22	0,26	0,11	1,58	0.4398
	Endo I/II	5	0,15	0,11	0,19	0,04	0,25	0,04	0,26	

hsa-miR-654	Endo III/IV	4	0,98	1,38	0,45	0,07	1,9	0,05	2,98	0.2457
	Controle	4	0,52	0,37	0,44	0,28	0,75	0,17	1,03	
	Endo I/II	4	0,14	0,12	0,13	0,04	0,24	0,03	0,26	
	Endo III/IV	4	0,44	0,54	0,26	0,09	0,79	0,02	1,21	
hsa-miR-654- 3p	Controle	5	1,19	1,32	0,7	0,41	1,15	0,23	3,47	0.2246
	Endo I/II	4	1,19	0,72	1,04	0,61	1,78	0,61	2,1	
	Endo III/IV	4	3,02	2,29	2,46	1,29	4,75	1,04	6,1	
	Controle	5	1,95	0,73	1,84	1,46	2,34	1,13	2,98	
hsa-miR-655	Endo I/II	5	1,66	1,27	2,03	0,63	2,14	0,18	3,34	0.4819
	Endo III/IV	5	1,14	1,01	0,88	0,39	2,11	0,03	2,27	
	Controle	5	99832,45	223227,41	2,22	1,4	3,93	0,9	499153,78	
	Endo I/II	3	6,74	6,33	4,39	1,93	13,91	1,93	13,91	
hsa-miR-656	Endo III/IV	3	4,21	6,54	0,66	0,21	11,76	0,21	11,76	0.3932
	Controle	5	7,49	7,77	4,88	1,96	8,35	1,72	20,53	
	Endo I/II	5	6,56	4,53	4,35	3,21	11,07	2,35	11,83	
	Endo III/IV	5	4,91	6,53	2,23	1,8	2,24	1,7	16,59	
hsa-miR-660	Controle	5	0,46	0,43	0,3	0,24	0,34	0,18	1,22	

hsa-miR-661	Endo I/II	5	0,21	0,2	0,17	0,05	0,28	0,03	0,51	0.3946
	Endo III/IV	5	0,22	0,22	0,2	0,04	0,3	0,01	0,55	
	Controle	5	0,87	0,37	0,94	0,59	1	0,44	1,37	
	Endo I/II	5	0,49	0,19	0,49	0,34	0,53	0,31	0,77	0.08046
	Endo III/IV	5	0,38	0,23	0,34	0,22	0,58	0,11	0,63	
hsa-miR-663B	Controle	5	1,3	0,91	1,26	0,68	2,2	0,16	2,23	
	Endo I/II	5	0,23	0,1	0,23	0,17	0,27	0,1	0,37	0.1142
	Endo III/IV	5	0,25	0,15	0,24	0,18	0,26	0,07	0,48	
hsa-miR-664	Controle	5	0,7	0,37	0,67	0,59	0,76	0,21	1,25	
	Endo I/II	5	0,61	0,61	0,38	0,31	0,46	0,22	1,69	0.2299
	Endo III/IV	5	0,4	0,48	0,18	0,15	0,43	0,03	1,21	
hsa-miR-668	Controle	5	0,44	0,37	0,36	0,15	0,54	0,13	1,03	
	Endo I/II	5	0,31	0,18	0,23	0,2	0,35	0,19	0,61	0.9788
	Endo III/IV	4	1,33	2,21	0,28	0,16	2,5	0,11	4,65	
hsa-miR-671- 3p	Controle	5	1,27	0,37	1,25	1,24	1,28	0,76	1,8	
	Endo I/II	5	1,52	1,07	1,51	0,84	2,53	0,13	2,6	0.9608
	Endo III/IV	5	1,42	1	1,03	1	2,07	0,24	2,77	

hsa-miR-675	Controle	5	0,94	0,31	0,89	0,69	1,1	0,63	1,38	0.4025
	Endo I/II	5	0,52	0,55	0,22	0,19	0,57	0,17	1,47	
	Endo III/IV	5	1,1	1,3	0,47	0,2	1,42	0,17	3,25	
hsa-miR-7-2#	Controle	5	0,89	1,14	0,47	0,15	0,98	0,04	2,81	0.957
	Endo I/II	3	0,78	0,59	0,46	0,41	1,45	0,41	1,45	
	Endo III/IV	5	0,76	0,74	0,88	0,12	0,94	0,01	1,85	
hsa-miR-708	Controle	5	0,82	0,54	0,88	0,35	1,06	0,25	1,58	0.495
	Endo I/II	5	0,81	0,31	0,73	0,66	0,86	0,5	1,33	
	Endo III/IV	3	0,46	0,48	0,35	0,05	0,99	0,05	0,99	
hsa-miR-720	Controle	5	0,7	0,47	0,54	0,5	1,01	0,12	1,33	0.6126
	Endo I/II	5	3,89	6,12	0,81	0,59	2,96	0,41	14,68	
	Endo III/IV	5	0,74	0,37	0,59	0,54	0,87	0,38	1,33	
hsa-miR-744#	Controle	5	1,34	0,58	1,15	1,08	1,71	0,64	2,12	0.425
	Endo I/II	4	0,77	0,42	0,6	0,54	1	0,49	1,39	
	Endo III/IV	5	1,34	1,29	1,46	0,02	2,55	0,02	2,65	
hsa-miR-744	Controle	5	0,79	0,14	0,85	0,79	0,86	0,55	0,88	0.1119
	Endo I/II	5	0,57	0,23	0,53	0,39	0,58	0,39	0,95	

hsa-miR-758	Endo III/IV	5	0,5	0,18	0,54	0,44	0,59	0,24	0,71	0.054
	Controle	5	1,14	0,41	1,04	0,97	1,1	0,75	1,83	
	Endo I/II	5	0,99	0,83	0,58	0,4	1,73	0,21	2,04	
	Endo III/IV	3	2,72	1,15	2,25	1,89	4,03	1,89	4,03	
hsa-miR-766	Controle	5	0,45	0,28	0,33	0,3	0,48	0,22	0,92	0.4025
	Endo I/II	5	0,52	0,21	0,6	0,39	0,62	0,24	0,77	
	Endo III/IV	5	0,33	0,21	0,3	0,2	0,39	0,12	0,67	
	Controle	5	1,26	0,31	1,22	1,15	1,23	0,93	1,78	
hsa-miR-769- 5p	Endo I/II	5	0,75	0,56	0,51	0,47	1,09	0,14	1,55	0.357
	Endo III/IV	5	1,17	1,14	1,16	0,39	1,21	0,07	3,01	
	Controle	3	2,65	3,3	1,1	0,41	6,44	0,41	6,44	
	Endo I/II	5	1,99	1,98	0,98	0,87	2,18	0,59	5,36	
hsa-miR-770- 5p	Endo III/IV	3	3,47	4,23	1,08	0,97	8,35	0,97	8,35	0.804
	Controle	5	5,03	2,8	5,64	2,47	7,17	1,78	8,07	
	Endo I/II	4	1,53	2,34	0,4	0,3	2,76	0,29	5,05	
	Endo III/IV	3	9,93	10,93	7,98	0,11	21,71	0,11	21,71	
hsa-miR-874	Controle	5	6,78	6,31	3,78	3,13	7,16	2,27	17,58	

hsa-miR-875-5p	Endo I/II	5	2,02	2,36	0,67	0,67	2,78	0,16	5,84	0.1367
	Endo III/IV	5	3,77	2,62	3	2,2	5,73	0,76	7,17	
	Controle	5	0,87	0,62	0,53	0,5	0,93	0,47	1,93	
	Endo I/II	5	2,01	1,11	2,52	1,12	2,64	0,59	3,2	0.1054
	Endo III/IV	5	1,02	0,31	0,93	0,89	1,3	0,63	1,36	
hsa-miR-876-3p	Controle	4	3,81	2,25	4,54	2,22	5,4	0,64	5,54	
	Endo I/II	3	2,45	0,77	2,31	1,76	3,29	1,76	3,29	0.3284
	Endo III/IV	4	5,06	3,43	6,18	3,1	7,03	0,05	7,84	
hsa-miR-876-5p	Controle	5	1,86	2,02	1,16	0,24	2,88	0,12	4,9	
	Endo I/II	4	0,6	0,29	0,67	0,4	0,81	0,2	0,88	0.4525
	Endo III/IV	4	1,38	0,97	1,03	0,74	2,02	0,67	2,78	
hsa-miR-885-5p	Controle	5	0,76	0,48	0,58	0,39	1,17	0,31	1,36	
	Endo I/II	4	13,19	20,98	3,93	1,01	25,37	0,45	44,43	0.1728
	Endo III/IV	4	0,8	0,8	0,56	0,23	1,38	0,16	1,93	
hsa-miR-886-3p	Controle	5	0,65	0,43	0,6	0,34	0,69	0,27	1,36	
	Endo I/II	5	1,32	1,12	1,29	0,56	1,64	0,12	3,02	0.4025
	Endo III/IV	5	0,51	0,3	0,38	0,34	0,51	0,31	1,04	

hsa-miR-886-5p	Controle	5	1,6	2,34	0,54	0,43	1,18	0,13	5,73	0.1637
	Endo I/II	5	1,18	0,91	1,01	0,82	1,23	0,17	2,65	
	Endo III/IV	5	0,26	0,12	0,24	0,19	0,27	0,15	0,45	
hsa-miR-889	Controle	5	3,08	4,07	1,25	0,83	2,5	0,57	10,23	0.3569
	Endo I/II	3	0,63	0,71	0,23	0,2	1,44	0,2	1,44	
	Endo III/IV	3	3,27	4,14	1,62	0,21	7,98	0,21	7,98	
hsa-miR-892b	Controle	5	12,8	17,71	4,95	4,75	5,42	4,4	44,46	0.6126
	Endo I/II	5	21,37	20,4	10,26	4,83	41,98	4,66	45,11	
	Endo III/IV	5	13,88	19,67	4,82	4,54	9,85	1,53	48,66	
hsa-miR-9#	Controle	5	1,61	1,19	1,2	1,05	2,19	0,26	3,36	0.2906
	Endo I/II	4	1,31	0,9	1,37	0,7	1,91	0,16	2,34	
	Endo III/IV	3	3,45	2,18	3,14	1,44	5,78	1,44	5,78	
hsa-miR-9	Controle	5	0,69	0,35	0,63	0,51	0,89	0,27	1,17	0.3391
	Endo I/II	4	1,91	2,73	0,57	0,5	3,31	0,5	5,99	
	Endo III/IV	4	1,01	0,3	1,01	0,78	1,24	0,67	1,36	
hsa-miR-92a	Controle	5	0,65	0,39	0,54	0,38	0,99	0,22	1,14	0.4025
	Endo I/II	5	0,39	0,19	0,44	0,23	0,55	0,17	0,58	

hsa-miR-92a-1#	Endo III/IV	5	0,32	0,16	0,26	0,24	0,45	0,11	0,51	0.1387
	Controle	5	1,12	0,66	1,16	0,53	1,34	0,49	2,09	
	Endo I/II	5	0,78	0,64	0,62	0,48	0,72	0,22	1,87	
	Endo III/IV	4	2,3	1,34	2,47	1,4	3,2	0,52	3,74	
hsa-miR-93#	Controle	5	0,57	0,4	0,33	0,28	0,9	0,24	1,09	0.5326
	Endo I/II	5	0,39	0,12	0,38	0,29	0,38	0,29	0,58	
	Endo III/IV	5	0,38	0,33	0,28	0,26	0,31	0,1	0,94	
	Controle	5	0,71	0,58	0,39	0,35	1,18	0,17	1,49	
hsa-miR-939	Endo I/II	5	2,84	5,92	0,15	0,1	0,44	0,08	13,42	0.6505
	Endo III/IV	5	0,8	1,09	0,26	0,18	0,88	0,04	2,66	
	Controle	5	0,43	0,57	0,17	0,14	0,39	0,03	1,43	
	Endo I/II	5	0,46	0,33	0,35	0,22	0,57	0,16	0,97	
hsa-miR-942	Endo III/IV	4	0,39	0,29	0,25	0,22	0,55	0,22	0,82	0.68
	Controle	5	1,81	1,54	1,61	0,59	2,16	0,45	4,26	
	Endo I/II	5	2,35	0,88	2,27	1,82	2,74	1,31	3,59	
	Endo III/IV	4	3,66	4,32	1,87	1,18	6,14	0,81	10,09	
hsa-miR-98	Controle	5	0,76	0,52	0,62	0,56	0,68	0,28	1,65	

hsa-miR-99a#	Endo I/II	5	0,51	0,46	0,38	0,22	0,81	0,01	1,15	0.6771
	Endo III/IV	5	1,76	1,84	1,1	0,17	3,18	0,13	4,2	
	Controle	5	1,15	0,96	0,78	0,73	1,49	0,13	2,64	
	Endo I/II	5	0,74	1,04	0,38	0,18	0,42	0,13	2,58	0.4677
	Endo III/IV	5	1,21	1,33	0,79	0,59	1,14	0,05	3,49	
hsa-miR-99a	Controle	5	1,52	0,7	1,54	0,87	2,21	0,77	2,22	
	Endo I/II	5	1,12	0,56	1,18	1,03	1,34	0,25	1,79	0.7558
	Endo III/IV	5	2,24	2,01	1,24	0,98	3,69	0,28	5,01	
hsa-miR-99b#	Controle	5	0,22	0,09	0,19	0,16	0,23	0,16	0,37	
	Endo I/II	5	0,23	0,11	0,18	0,14	0,33	0,12	0,37	0.6126
	Endo III/IV	5	0,46	0,47	0,29	0,19	0,47	0,09	1,25	
hsa-miR-99b	Controle	5	0,65	0,52	0,48	0,37	0,53	0,32	1,57	
	Endo I/II	5	0,43	0,19	0,31	0,31	0,58	0,25	0,68	0.5117
	Endo III/IV	5	0,41	0,29	0,27	0,23	0,61	0,13	0,81	
hsa-miR-129-2- 3p	Controle	5	4,1	3,44	3,45	2,49	4,69	0,32	9,56	
	Endo I/II	5	5,73	5,54	4,68	1,38	7,42	0,77	14,41	0.3263
	Endo III/IV	5	10,53	8,89	9,54	5,68	10,2	1,94	25,27	

hsa-miR-134-5p	Controle	5	3,42	3,88	2,17	1,07	2,87	0,79	10,2	0.3791
	Endo I/II	5	1,76	1,16	1,41	1,09	2,78	0,39	3,13	
	Endo III/IV	5	1,45	1,96	0,82	0,41	0,86	0,24	4,92	
hsa-miR-137	Controle	5	0,99	0,61	0,85	0,66	1,17	0,32	1,93	0.1106
	Endo I/II	4	1,57	1,06	1,79	0,83	2,31	0,11	2,57	
	Endo III/IV	2	2,97	0,76	2,97	2,43	3,51	2,43	3,51	
hsa-miR-140-5p	Controle	5	1,15	0,34	1,03	0,88	1,38	0,84	1,62	0.04372
	Endo I/II	5	0,64	0,17	0,61	0,55	0,77	0,42	0,86	
	Endo III/IV	5	0,82	0,28	0,71	0,61	0,89	0,61	1,28	
hsa-miR-187-3p	Controle	5	3,55	3,23	2,32	1,02	6,73	0,4	7,28	0.03835
	Endo I/II	3	2,56	1,28	2,59	1,27	3,83	1,27	3,83	
	Endo III/IV	4	0,3	0,46	0,1	0,05	0,55	0,01	0,99	
hsa-miR-374b-5p	Controle	5	0,88	0,47	1,06	0,68	1,2	0,15	1,29	0.2209
	Endo I/II	5	0,44	0,2	0,43	0,27	0,54	0,24	0,72	
	Endo III/IV	5	0,42	0,2	0,4	0,26	0,61	0,2	0,62	
hsa-miR-379-5p	Controle	5	1,08	0,55	1,23	0,67	1,27	0,4	1,82	0.1604
	Endo I/II	5	0,49	0,35	0,46	0,28	0,78	0,03	0,87	

hsa-miR-451a	Endo III/IV	5	0,72	0,44	0,96	0,5	1,05	0,04	1,06	0.3584
	Controle	5	0,32	0,57	0,05	0,02	0,19	0,01	1,33	
	Endo I/II	5	0,02	0,03	0,01	0,01	0,02	0,01	0,07	
	Endo III/IV	5	0,06	0,08	0,01	0	0,08	0	0,19	
hsa-miR-491- 5p	Controle	5	1,17	0,52	0,99	0,97	1,55	0,52	1,82	0.3296
	Endo I/II	5	0,72	0,38	0,77	0,46	0,82	0,27	1,27	
	Endo III/IV	5	0,88	0,5	0,82	0,8	1	0,21	1,6	
	Controle	5	1,85	0,48	2,07	1,57	2,18	1,14	2,3	
hsa-miR-495	Endo I/II	5	1,56	0,89	1,6	1,47	1,69	0,25	2,77	0.8869
	Endo III/IV	5	2,33	1,38	1,6	1,41	3,16	1,12	4,36	
	Controle	5	13,41	8,98	15,56	8,27	17,46	1,18	24,6	
	Endo I/II	4	10,35	6,58	10,56	6,28	14,42	2,08	18,19	
hsa-miR-615- 3p	Endo III/IV	4	9,89	6,32	11,54	6,1	13,69	0,87	15,63	0.8425
	Controle	5	0,52	0,32	0,43	0,27	0,57	0,27	1,04	
	Endo I/II	5	0,24	0,11	0,23	0,19	0,31	0,09	0,38	
	Endo III/IV	5	0,21	0,1	0,22	0,22	0,26	0,06	0,32	
hsa-miR-93-5p	Controle	4	1,71	1,51	1,62	0,43	3	0,28	3,34	0.06266
hsa-miR-96-5p	Controle	4	1,71	1,51	1,62	0,43	3	0,28	3,34	
	Controle	4	1,71	1,51	1,62	0,43	3	0,28	3,34	
	Controle	4	1,71	1,51	1,62	0,43	3	0,28	3,34	

hsa-miR-29a-3p	Endo I/II	4	1,54	1,16	1,72	0,62	2,47	0,1	2,64	0.6677
	Endo III/IV	4	0,99	0,83	0,86	0,45	1,53	0,12	2,12	
	Controle	5	1,13	1,57	0,42	0,3	0,79	0,24	3,92	
	Endo I/II	4	0,34	0,27	0,25	0,18	0,5	0,11	0,74	0.2934
	Endo III/IV	4	0,99	0,83	0,86	0,45	1,53	0,12	2,12	
hsa-miR-7-1-3p	Controle	5	0,61	0,18	0,61	0,53	0,76	0,35	0,81	
	Endo I/II	5	0,38	0,25	0,37	0,25	0,38	0,12	0,79	0.357
	Endo III/IV	5	0,55	0,48	0,44	0,33	0,53	0,08	1,35	