LIDIA HYUN JOO MYUNG

**Análise de marcadores protéicos no endométrio de mulheres
portadoras de endometriose profunda intestinal**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof Dr Maurício Simões Abrão

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Myung, Lidia Hyun Joo
Análise de marcadores protéicos no endométrio de
mulheres portadoras de endometriose profunda
intestinal / Lidia Hyun Joo Myung. -- São Paulo,
2019.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientador: Maurício Simões Abrão.

Descritores: 1.Endometriose 2.Biomarcadores
3.Endométrio 4.Proteômica 5.Espectrometria de massas
6.Neoplasias

USP/FM/DBD-187/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

“Feliz aquele que transfere o que sabe, e aprende o que ensina”

Cora Coralina

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Duk Jun Myung e Bok Hi Suh**, os maiores guerreiros que conheci em minha vida. Em suas tenras idades, agarraram-se a uma oportunidade de vida no Brasil. Dedicaram suas vidas inteiramente aos estudos de seus filhos, nos apoiando com o melhor que puderam, incondicionalmente em todas as etapas de nossas vidas. Minha mãe entre todos os obstáculos, sempre com um sorriso em seu semblante, iluminando a todos ao seu redor. Transmitiram-me os valores pelo exemplo, e que norteiam a minha vida e minha conduta: dignidade, honestidade, integridade, lealdade, respeito, humildade, eficiência e persistência.

Aos meus irmãos, **Viviane e Eduardo**, meus companheiros de sangue, muito obrigada por estarem ao meu lado desde a nossa infância, os nossos primeiros passos e até os nossos últimos dias.

À minha avó **Do Nan Suh**, e aos meus tios **Daniel e Domingos**, nosso esteio emocional e material durante os momentos mais difíceis e de necessidade. Em memória de minha tia **Sok**, minha madrinha espiritual e guerreira, que sempre esteve ao meu lado, nos momentos mais difíceis. Confiou no meu potencial, e de mim não desistiu até o final de sua vida. Vocês são responsáveis por essa vitória conquistada!

Ao **Ruy**, meu amado companheiro de vida e de alma, meu esteio espiritual, obrigada por me permitir voar, confiar em mim e respeitar minha missão. Por todos os anos que vivemos juntos e por não desistir, mesmo com todas as dificuldades.

Aos meus sobrinhos, **Lucas e Pedro**, que despertam o que há de mais puro amor dentro de mim.

A toda a **minha família e amigos**, razões do meu viver. Muito obrigada!!

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial imensurável ao **Professor Doutor Maurício Simões Abrão**. Meu tutor e padrinho profissional desde os meus primeiros passos a esta profissão, sacerdócio abençoado da Medicina. Minha gratidão e lealdade eternas a quem foi um dos únicos a não desistir do meu potencial, quando dos momentos mais desesperançosos de minha vida. Me apoiou quando eu não tinha nada para retribuir em troca. Tornou-se figura inspiradora do meu crescimento. Mestre e líder, ensinou-me a praticar a Medicina com eficiência, carinho e cuidado. Dotado de energia e ideais inspiradores, sempre buscando inovar e agregar os que se aproximam, ensina aos seus alunos a beleza e a importância da Ciência, e da Medicina Humana Baseada em Evidências. Querido Professor, muito obrigada por todas as oportunidades, pela paciência e por acreditar no nosso potencial;

Ao **Professor Doutor Edmund Chada Baracat** pela oportunidade de aprender, trabalhar e contribuir para a Pós Graduação da Disciplina de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas orientações e pelo apoio em todas as etapas da Dissertação de Mestrado;

Ao **Professor Doutor Sérgio Podgaec**, a quem agradeço pelo apoio e incentivo a esse tema de Mestrado, e pelos inúmeros ensinamentos e oportunidades;

Ao **Professor Doutor Edécio Cunha** e à **Dra Aline Martins** por todo o apoio, ensinamentos e pela disponibilidade do tempo dispendido. Agradeço por terem sido fundamentais na conclusão deste trabalho;

À **Dra. Renata Coudry** pela paciência, por compartilhar conhecimento, e por ter sido papel fundamental na conclusão do tema desta dissertação;

Ao Professor **Doutor Arlindo Moura, Professor Doutor Leonardo Bezerra, Dra Julia Bezerra, Dra Kathiane Lustosa, Dra Raphaela Menoli** pela paciência e parceria, por compartilharem amostras, análises e conhecimento, e por terem sido papel fundamental na conclusão deste trabalho;

À **Professora Doutora Rosanne Kho**, por ser exemplo de competência acadêmica, de ensino e pesquisa. Sua presença que ilumina a todos que tem oportunidade de conhecê-la. Obrigada por compartilhar conhecimento, e por ter sido papel fundamental na conclusão do artigo científico deste trabalho;

Aos colegas e amigos **João Antonio Dias Júnior, Luiz Flávio Fernandes, Patrick Bellelis, Giuliano Borrelli, Marina Andres, Fernanda Okita, Tácito Augusto, Rodrigo Barbosa, Mariana Vieira, Talitha Araújo** e todos os outros membros do setor de endometriose pelo incentivo, apoio e parceria. Às queridas **Marta Privato, Maricy Rarched, Malu Marin** pelo apoio incondicional para as etapas iniciais do Projeto de Pesquisa e preservação das amostras;

Às **pacientes**, inspiração de todo o trabalho, a quem assistimos, estudamos e pesquisamos. Que este trabalho nos inspire a encontrar um tratamento digno de que merecem. Meu muito obrigada!

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Endometriose.....	2
1.2 Proteômica	4
1.2.1 Eletroforese bidimensional.....	5
1.2.2 Espectrometria de massas	6
1.2.3 Proteômica <i>Shotgun/ Bottom-up</i>	7
1.3 Proteômica e biomarcadores em endometriose	8
2. OBJETIVO	12
3. PACIENTES E MÉTODO.....	14
3.1 Local de estudo e pacientes	14
3.1.1 Número de pacientes estudados	15
3.1.2 Critérios de inclusão	15
3.1.3 Critérios de exclusão	16
3.1.4 Dinâmica do estudo	16
3.2 Coleta de amostras	17
3.3 Extração de proteínas	17
3.4 Digestão de proteínas	18
3.5 Dessalinização peptídica	18
3.6 Espectrometria de massas	20
3.7 Delineamento experimental e análise dos dados	21

4. RESULTADOS	25
4.1 Avaliação clínica	25
4.2 Análise de proteínas	28
4.2.1 Identificação de proteínas diferencialmente expressas no endométrio.....	28
4.2.2 Análise biológica e funcional das proteínas por software de bioinformática	28
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	52
7. ANEXOS	54
8. REFERÊNCIAS	112

LISTA DE ABREVIATURAS

AGC	<i>Automatic Gain Control</i>
ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
oC	Graus Celsius
CA	<i>California</i>
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
DDA	<i>Data - Dependent Acquisition</i>
DTT	Ditiotreitol
ESI	<i>Electron Spray Ionization</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT-ICR	<i>Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry</i>
FXR	<i>Farnesoid X Receptor</i>
g	gramas
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>
GOA	<i>Gene Ontology Annotation</i>
h	Horas
HCD	<i>Higher-energy Collisional Dissociation</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IAA	Iodoacetamida

IMC	Índice de Massa Corporal
InCor	Instituto do Coração
IVDMIA	<i>In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assay</i>
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
kDa	Quilodalton
Kg	Quilogramas
LBPQ	Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas
LXR	<i>Liver X Receptors</i>
m	metros
mg	miligramas
mm	milímetros
M	Molar
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
m/z	Relação massa- carga
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
p	Probabilidade de significância
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotações por minute
RX	X Receptor
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
SELDI-TOF MS	<i>Surface Enhanced Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry</i>

STRAP	<i>Software Tool for Rapid Annotation of Proteins</i>
TEAB	Triethylammonium Bicarbonate
TFA	Ácido Trifluoroacético
UFC	Universidade Federal do Ceará
UK	<i>United Kingdom</i>
UnB	Universidade de Brasília
V	Volts
μl	Microlitros
μm	Micrômetros

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados clínicos, fase do ciclo menstrual e estágio de doença das pacientes incluídas no estudo nos grupos controle e endometriose.....	27
Tabela 2 - Principais proteínas com expressão aumentada no grupo endometriose.....	28
Tabela 3 - Principais proteínas com expressão reduzida no grupo endometriose.....	29
Tabela 4 - Principais proteínas diferencialmente expressas no grupo endometriose (estádio II), de acordo com fase do ciclo menstrual.....	32
Tabela 5 - Principais proteínas diferencialmente expressas no grupo endometriose (estádio IV), de acordo com fase do ciclo menstrual.....	33
Tabela S1 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (todos os grupos).....	76
Tabela S2 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estádio II, fase menstrual proliferativa).....	78
Tabela S3 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estágio IV, fase menstrual proliferativa).....	81
Tabela S4 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estádio II, fase menstrual secretora).....	87
Tabela S5 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estádio IV, fase menstrual secretora).....	91

Tabela S6 - Redes de interação mais significativas das proteínas diferencialmente expressas em pacientes com endometriose.....	92
Tabela S7 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase proliferativa, estágio II).....	97
Tabela S8 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase proliferativa, estágio IV).....	101
Tabela S9 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase secretora, estágio II).....	105
Tabela S10 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase secretora, estágio IV).....	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Equipamento de espectrômetro de massas: composto por uma fonte ionizante, analisadora, e detectora.....	6
Figura 2 - Plataforma Qubit™ (Thermo Fisher, EUA) para quantificação peptídica.....	19
Figura 3 - Espectrômetro de massas híbrido Thermo Scientific Orbitrap Elite® (Thermo Scientific).....	20
Figura 4 - Fluxograma de pacientes do estudo.....	26
Figura 5a - Análise das principais interações de proteínas diferencialmente expressas no grupo endometriose em comparação ao grupo controle pelo <i>software</i> IPA (IPA; <i>Ingenuity Systems, Redwood City, CA, EUA</i>).....	37
Figura 5b - Análise das principais interações de proteínas diferencialmente expressas na forma grave da endometriose (estádio IV), e na fase menstrual proliferativa, pelo <i>software</i> IPA (IPA; <i>Ingenuity Systems, Redwood City, CA, EUA</i>).....	38
Figura 5c - Análise das principais interações de proteínas diferencialmente expressas na forma grave da endometriose (estádio IV), e na fase menstrual secretora, pelo <i>software</i> IPA (IPA; <i>Ingenuity Systems, Redwood City, CA, EUA</i>).....	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Comparação entre grupos de proteínas diferencialmente expressas em endométrio de pacientes com endometriose (categoria por localização celular).....34

Gráfico 2- As vias canônicas mais significativas nas pacientes com endometriose, de acordo com a análise do *software Ingenuity Pathway Analysis* (IPA)35

RESUMO

Myung, LHJ. *Análise de marcadores protéicos no endométrio de mulheres portadoras de endometriose profunda intestinal* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: A endometriose é doença ginecológica prevalente, com intervalo de tempo longo entre o início dos sintomas e o diagnóstico definitivo. A endometriose profunda intestinal se apresenta com sintomas mais severos, e maior morbidade cirúrgica. Um método minimamente invasivo para o diagnóstico precoce se faz necessário, e impediria a progressão para as formas mais profundas da doença. Estudos de biomarcadores com técnicas em proteômica podem trazer melhor entendimento das bases moleculares da doença, possibilidade de diagnóstico precoce, e do desenvolvimento de terapias-alvo. **OBJETIVO:** Comparar o perfil de expressão de proteínas do endométrio tópico entre pacientes saudáveis e com endometriose profunda intestinal, por técnica de espectrometria de massas *shotgun*. **MÉTODOS:** Estudo caso-controle exploratório, com total de 24 pacientes divididas em dois grupos: pacientes com endometriose profunda intestinal com comprovação cirúrgica, e pacientes do grupo controle saudável submetidas a cirurgia de laqueadura tubárea. Amostras de endométrio tópico foram obtidas por meio de auxílio de catéter de aspiração. As amostras foram submetidas a extração, digestão, dessalinização peptídica, e analisadas seguindo uma abordagem de espectrometria de massas *shotgun*, *label-free* de DDA (aquisição dependente de dados), utilizando o instrumento *Orbitrap Elite* (Thermo Fisher, EUA). **RESULTADOS:** a análise proteômica dos resultados foi realizada através do software *Progenesis Q1* (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK), e resultou em um painel de 595 proteínas diferencialmente expressas entre os grupos controle e endometriose. Os resultados revelaram diferentes moléculas de acordo com a fase do ciclo menstrual, e o estágio da doença. As principais proteínas com expressão aumentada no grupo de pacientes com endometriose incluíram SETSIP, SRRM2, CAPS, H2AFV e SAFB, enquanto moléculas reguladas negativamente incluíram BPIFB1, FAM184A, SLPI, PIGR, JCHAÍNA,

HLA-A e LTF. As proteínas diferenciais entre os grupos apresentaram o câncer como principal doença associada (p - valor de $4,14E-02$ – $3,91E-08$), de acordo com as análises realizadas pelo *software IPA (Ingenuity Pathway Analysis System; Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA)*. As principais proteínas com expressão aumentada nos estádios mais avançados da doença foram CHMP4B, DES, EIF3I, CDH13, LIMS1, HSPA4, HSP90AB1, TUBB, NPM1, MYL6, e foram descritas relacionadas a metástases e pior prognóstico de diversos tipos de cânceres. **CONCLUSÃO:** CHMP4B, DES, EIF3I, CDH13, LIMS1, HSPA4, HSP90AB1, TUBB, NPM1, MYL6 são proteínas com expressão aumentada no endométrio das pacientes portadoras de endometriose profunda intestinal em estádios avançados. O presente estudo revelou proteínas diferencialmente expressas na endometriose em associação com diversos tipos de cânceres. Os achados constituem possíveis marcadores para o desenvolvimento de técnicas para o diagnóstico minimamente invasivo, e potenciais alvos terapêuticos para a doença.

Descritores: Endometriose; Biomarcadores; Endométrio; Proteômica; Espectrometria de massas; Neoplasias.

SUMMARY

Myung, LHJ. *Analysis of protein markers in the endometrium of women with deep intestinal endometriosis* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

INTRODUCTION: Endometriosis is a prevalent gynecological disease, with a long time elapsed from onset of symptoms to definitive diagnosis. Deep intestinal endometriosis presents with more severe symptoms, and greater surgical morbidity. A minimally invasive method for early diagnosis becomes necessary and would prevent progression to the deeper presentations of the disease. Studies of biomarkers with proteomics techniques can provide a better understanding of the molecular basis of the disease, the possibility of early diagnosis, and the development of targeted therapies. **OBJECTIVE:** To compare the expression of eutopic endometrial proteins between healthy and deep intestinal endometriosis patients, using a shotgun mass spectrometry technique. **METHODS:** An exploratory case-control study with a total of 24 patients divided in two groups: patients with intestinal deep endometriosis with surgical confirmation, and patients in the healthy control group submitted to tubal ligation surgery. Eutopic endometrial samples were obtained by aspiration catheter. The samples were submitted to extraction, digestion, peptide desalting and analyzed using a DDA (data-dependent acquisition) label-free mass spectrometry approach by the Orbitrap Elite instrument (Thermo Fisher, USA). **RESULTS:** Proteomic analysis was performed using the Progenesis QI software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) to profile 595 differentially expressed proteins between the control and endometriosis groups. The results revealed different molecules according to the phase of the menstrual cycle and stage of disease. Top upregulated molecules included SETSIP, SRRM2, CAPS, H2AFV, and SAFB, whereas downregulated molecules included BPIFB1, FAM184A, SLPI, PIGR, JCHAIN, HLA-A, and LTF. Among top diseases associated molecules between groups were related to cancer (p - value of 4.14E-02 - 3.91E-08), according to the analysis performed by IPA software (Ingenuity Pathway Analysis System, Ingenuity Systems,

Redwood City, CA, USA). Top upregulated proteins among patients with advanced stage of endometriosis were CHMP4B, DES, EIF3I, CDH13, LIMS1, HSPA4, HSP90AB1, TUBB, NPM1, MYL6. Those proteins were related to metastasis and poor survival of several cancer types. **CONCLUSION:** CHMP4B, DES, EIF3I, CDH13, LIMS1, HSPA4, HSP90AB1, TUBB, NPM1, MYL6 are among the top upregulated proteins in patients with advanced stage of deep intestinal endometriosis. The present study revealed proteins differentially expressed in endometriosis as potential biomarkers for the development of techniques for minimally invasive diagnosis, and potential therapeutic targets for the disease.

Descriptors: Endometriosis; Biomarkers; Endometrium; Proteomics; Mass Spectrometry; Neoplasms.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Endometriose

A endometriose é definida pela presença de glândula e/ou estroma endometriais fora da cavidade uterina (1). Estima-se que 10 a 15% da população feminina em idade fértil seja acometida pela doença. Aproximadamente 50% das mulheres com infertilidade (2) e 62% de adolescentes com dismenorréia severa podem ser diagnosticadas com endometriose (3).

O quadro clínico é caracterizado por dismenorréia, dor pélvica acíclica, dispareunia de profundidade, alterações intestinais e urinárias cíclicas, e infertilidade (4). Estima-se uma média de tempo de 7 anos entre o início dos sintomas da endometriose e seu diagnóstico (5). A doença, de percurso crônico, resulta em importante prejuízo na qualidade de vida, impacto sócio - econômico, além de importante problema de saúde pública (6-8).

Diversas teorias são propostas para a patogênese da endometriose. A teoria da menstruação retrógrada (9) é baseada no fato de que o tecido endometrial seria conduzido através das trompas de Falópio até a cavidade peritoneal durante o período menstrual. No entanto esta teoria não é considerada isoladamente um mecanismo causador da doença, pois a menstruação retrógrada é observada em mais de 90% das mulheres (10). A teoria da metaplasia celômica (11) explicaria a transformação de células totipotentes do mesotélio da cavidade peritoneal em células endometriais, em resposta ao estímulo de esteróides ovarianos (12). Outras teorias associadas às anteriores seriam a da disseminação vascular e/ou linfática das células endometriais a distância (13); a neoangiogênese envolvida no estabelecimento e manutenção da endometriose (14, 15); a influência de mecanismos moleculares e imunológicos do fluido peritoneal (16-19); a predisposição genética (20) e a influência dos fatores ambientais (21).

A classificação proposta pela antiga *American Fertility Society* em 1978 e revisada em 1985 e 1996 (22) caracterizou a endometriose em quatro estádios de acordo com a localização e extensão das lesões e aderências visualizadas

em cirurgia (**Anexo A**). Cornillie et al. (1990) classificaram a doença em superficial e profunda para lesões menores, ou maiores e iguais a 5mm de infiltração na superfície peritoneal, respectivamente (23). A endometriose profunda é a forma mais agressiva da doença, podendo acometer os ovários, região retrocervical, o septo retovaginal, o reto, o sigmóide, os ureteres, a bexiga, ou até envolver linfonodos da região pélvica (24, 25). Nisolle e Donnez (1997) classificaram a endometriose em três afecções distintas: a doença peritoneal, a doença ovariana e a endometriose de septo reto-vaginal. Atualmente a doença do septo reto-vaginal é considerada quando ocorre o acometimento profundo do compartimento posterior da pelve (26). A endometriose profunda é associada a sintomas mais exuberantes, quando comparada a doença nas suas formas peritoneal ou ovariana (27, 28). O comprometimento intestinal pode ser encontrado em 12% dos casos (29, 30), e em 90% delas o retossigmóide se encontra acometido (31-33). A endometriose intestinal apresenta-se associada a sintomas intestinais tais como disquezia e hematoquezia cíclicas, além de alterações no trânsito intestinal (32), e maior prejuízo na qualidade de vida (34). Existe uma alta prevalência de morbidade e complicações relacionadas ao tratamento cirúrgico da endometriose profunda intestinal descritas na literatura, tais como fístulas (0 - 4%), hemorragia (1 - 11%), infecções (1 - 3%), disfunções urinárias (1 - 17%) e intestinais (1 - 15%) (27).

O diagnóstico definitivo da endometriose depende da confirmação histológica das lesões (35), no entanto, pode-se direcionar a suspeita diagnóstica através do quadro clínico (36). Os exames de imagem como a ressonância magnética (37) e a ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal possuem boa acurácia para suspeita de casos de endometriose profunda (38), (39) (40), mas apresentam limitações no diagnóstico das formas superficiais e iniciais da doença. Existe portanto, uma necessidade no desenvolvimento de ferramentas para o diagnóstico precoce. A procura por biomarcadores através de técnicas da era “ômica” têm sido empregadas nas pesquisas em endometriose (41), como um possível caminho para o diagnóstico precoce da doença. A genômica e a epigenômica trazem informações relevantes em seus resultados, no entanto a proteômica se

correlaciona mais diretamente com os processos funcionais e biológicos da doença (42).

1.2 Proteômica

O termo "proteômica" surgiu em 1990 pela fusão dos termos "proteína" e "genômica" (43, 44), e objetiva ao estudo da identificação, caracterização e quantificação de todas as proteínas de um proteoma.

O estudo de um proteoma é mais desafiador do que a do seqüenciamento de um genoma, devido às suas diferentes características de expressão, localização celular, interações, modificações pós- transacionais, *turnover* funcional e espacial. Estima-se que existam mais de 100.000 formas de proteínas codificadas por aproximadamente 20.235 genes do genoma humano (45).

As proteínas constituem moléculas diretamente envolvidas em todas as reações orgânicas dos seres vivos (46). O estudo de suas funções e interações podem fornecer mais informações sobre uma doença se comparado à análise genômica, devido à baixa correlação entre o genótipo e fenótipo nas doenças (42).

Mudanças na quantificação de determinadas proteínas refletem processos biológicos específicos ou de doença, que poderiam ser usadas como biomarcadores, para melhor entendimento dos processos de doença, diagnóstico precoce, monitorização clínica e desenvolvimento de terapias-alvo (47), (48).

Técnicas em proteômica têm sido amplamente aplicadas no estudo de diversas doenças oncológicas (49), auto-imunes (50), infecciosas (51), inflamatórias (52), (53), cardiovasculares (54), endocrinológicas entre outras (55).

Fluidos biológicos como plasma e urina, apesar de serem facilmente coletadas, apresentam pouca aplicabilidade para identificação de biomarcadores por técnicas proteômicas, devido a alta concentração de proteínas do plasma, dificultando a identificação de proteínas de baixo peso molecular (56). Além disso por estarem distantes da lesão a ser estudada,

marcadores específicos da doença estariam presentes em menor proporção nos fluidos perféricos (57). Por esse motivo, tem sido proposto o estudo de amostras coletadas próximas à lesão, como por exemplo o endométrio para a endometriose ou o fluido ascítico no câncer de ovário (56, 58).

As principais técnicas utilizadas em pesquisas sobre proteômica têm sido a eletroforese bidimensional com suas variantes, e a espectrometria de massas. Apesar das técnicas em proteômica revelarem marcadores em potencial, poucos têm apresentado aplicabilidade clínica para o rastreamento de doenças e seguimento do tratamento (46). O OVA1 foi o primeiro biomarcador identificado por técnica proteômica e recentemente aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA). Constitui-se em um diagnóstico *in vitro* por ensaio indexado multivariado (IVDMIA), que inclui 5 biomarcadores para avaliação pré-operatória do risco de câncer de ovário (59).

1.2.1 Eletroforese bidimensional

A eletroforese é uma técnica de separação de proteínas baseada na migração de moléculas carregadas, numa solução, em função da aplicação de um campo elétrico (60). A variante bidimensional consiste em separar as proteínas em duas etapas. Na primeira, é feita a separação por ponto isoelétrico, através de géis de acrilamida em forma de tiras com PH imobilizado, e na segunda etapa em função de sua massa molecular (60).

Desvantagens da técnica estão no fato de que a análise é dispendiosa no tempo, permite a identificação apenas individual de cada vez dos *spots* em gel, e não permite o reconhecimento de proteínas com pesos moleculares muito altos ou muito baixos (46). O grande desafio no estudo da proteômica em géis está na obtenção de amostras reprodutíveis. As técnicas em eletroforese por suas limitações tem sido associadas ou substituídas por técnicas em larga escala por espectrometria de massas (61), que aliadas ao desenvolvimento de protocolos mais apurados no preparo de amostras, tem permitido a identificação e a quantificação de proteínas de menor abundância envolvidas nas doenças (62).

1.2.2 Espectrometria de massas

O espectrômetro de massas é um instrumento analítico capaz de converter moléculas neutras em íons na forma gasosa e separá-las de acordo com a sua razão massa/carga, utilizando para isso campos eletromagnéticos (**Figura 1**). Esse equipamento atua como uma balança de íons de altíssima precisão e, em sua grande maioria, é composto por uma fonte ionizante, analisadora, e detectora. Como resultado é emitido um gráfico que representa a intensidade do sinal dos íons, e a razão massa/carga (63).

FONTE: Optonom.com.tr

Figura 1- Equipamento de espectrômetro de massas: composto por uma fonte ionizante, analisadora, e detectora. O resultado é um gráfico que representa a intensidade do sinal dos íons, e a razão massa/carga.

Recentemente foram desenvolvidas técnicas capazes de ionizar biomoléculas de alto peso molecular e proteínas. Estas técnicas também são capazes de alterar o analito de sua fase sólida ou líquida para gasosa, estado necessário para realização da análise da espectrometria de massas sem degradá-lo. Tais técnicas foram denominadas *matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI) (64) e *electron spray ionization* (ESI).

Uma variante da técnica de ionização MALDI é a chamada *Surface Enhanced Laser Desorption Ionization – Time of Flight* (SELDI-TOF MS), que dá

preferência ao estudo de peptídeos hidrofóbicos de baixo peso molecular (<10kDa) e permite a análise de amostras com menor quantidade, o que ocorre comumente em coletas de amostras clínicas (42, 64).

Uma das forças que impulsiona a proteômica nos dias atuais é o advento de softwares em bioinformática, que permitem interpretar os dados resultantes da análise por espectrometria de massas, identificando-se sequências de peptídeos em bancos de dados de proteínas. Dois tipos de resultados são avaliados, o primeiro usa a informação relativa à massa molecular dos peptídeos oriundos da digestão enzimática (*Peptide Mass Fingerprint*), enquanto o segundo faz uso de resultados obtidos pela fragmentação de peptídeos individuais previamente detectados (65), (66).

1.2.3 Proteômica *Shotgun/ Bottom-up*

Proteômica "*bottom-up*" se refere a caracterização de proteínas pelo resultado da fragmentação das mesmas em um conjunto de peptídeos. Quando aplica-se essa análise a uma mistura complexa de proteínas de uma amostra biológica, chamamos de proteômica *shotgun*, termo batizado por Yates pela sua analogia com o seqüenciamento genômico *shotgun* (67).

A proteômica *shotgun* oferece uma análise indireta, através da comparação dos peptídeos de uma amostra biológica, derivados da espectrometria de massas, com um espectro de padrão de peptídeos em um banco de dados (*in silico*) (46).

As vantagens dessa técnica estão em permitir (46):

- maior precisão, sensibilidade e acurácia dentre as técnicas modernas de espectrometria de massas;
- avaliação em maior escala, maior reprodutibilidade e menor tempo comparado às técnicas clássicas em gel de eletroforese;
- maior capacidade de quantificação e detecção das modificações pós translacionais e de isoformas das proteínas;
- maior capacidade de análise de amostras biológicas com quantidade reduzida ou escassa.

Recentemente novas tecnologias em aparelhos híbridos tem sido desenvolvidos com diferentes fontes de fragmentação e ionização óptica, contribuindo para melhor acurácia da técnica para misturas complexas de peptídeos. Pode-se citar os analisadores de massas de baixa resolução: o quadrupolo, o *ion trap* tridimensional ou linear; e analisadores de alta resolução: o tempo de voo, transformada de Fourier de Ressonância Cíclotron de Íons (FT-ICR) e *Orbitrap*. O *Orbitrap* tem se demonstrado vantajoso na rapidez e sensibilidade particularmente para amostras menores (46, 68). Estudos publicados até hoje em proteômica e endometriose encontraram limitações em seus resultados devido a baixa reprodutibilidade das técnicas baseada em géis (46), e da baixa precisão dos resultados derivados das análises em espectrometria de massas (67), essas por sua vez restritas pela quantidade escassa de material que é obtida em amostras biológicas, a exemplo do endométrio.

A técnica *shotgun* de espectrometria de massas, aliada a tecnologia de aparelhos híbridos e softwares de bioinformática, traz uma nova proposta de análise com maior sensibilidade, maior reprodutibilidade, avaliação em larga escala com precisão e rapidez, e maior potencial em encontrar biomarcadores em seus resultados (69).

1.3 Proteômica e biomarcadores em endometriose

Os primeiros estudos em endometriose e proteômica têm publicações que datam de 2002 com um aumento exponencial nos últimos 10 anos. Os espécimes biológicos que vem sendo estudados são: plasma (8%), soro (28%), urina (8%), fluido endometrial (3%) e peritoneal (10%), endométrio eutópico (30%), endométrio ectópico da lesão de endometriose (8%) e sangue menstrual (5%) (62). Os estudos têm sido realizados em número pequeno de pacientes, com resultados preliminares não validados para o uso na prática clínica (70).

Liu et al. (2015) e Nisenblat et al. (2016) publicaram revisões sistemáticas sobre diversas categorias de estudos, incluindo proteômica, de biomarcadores em urina e no soro de mulheres com endometriose (71), (72).

Devido à heterogeneidade e ao alto risco de viés dos estudos incluídos, a utilidade clínica dos testes diagnósticos para endometriose permanece incerta. Nenhum dos biomarcadores avaliados nestas revisões puderam ser avaliados de forma significativa e houveram evidências insuficientes ou de baixa qualidade , .

May et al. (2011) e Gupta et al. (2016) publicaram revisões sistemáticas sobre as alterações endometriais e possíveis biomarcadores nas diversas categorias de estudos, e concluíram que os estudos em proteômica do endométrio incluiu um desenho exploratório com número pequeno de pacientes (56), (73). O endométrio de mulheres com endometriose apresenta características intrínsecas moleculares (74) , que promovem a sobrevivência e adesão dos focos resultantes da menstruação retrógrada ao peritônio. Características moleculares específicas do endométrio de mulheres com endometriose revelam responsividade ao estímulo hormonal, estímulo a neoangiogênese e capacidade de invasão , além de desbalanço na expressão gênica e da produção de proteínas (75) .

A relativa facilidade na obtenção de biópsias endometriais na prática clínica, e sua maior proximidade com o sítio da doença, faz do endométrio uma potencial ferramenta diagnóstica. A identificação de diferenças na expressão de proteínas entre mulheres com e sem a doença poderia ser utilizada como um biomarcador para a endometriose . As lesões de endometriose profunda intestinal (endométrio ectópico) apresentam reação de fibrose e metaplasia muscular ao redor de seu componente histológico estromal em aproximadamente 80% dos casos (76), tornando a representatividade do componente estromal e glandular por vezes escasso nas amostras da lesão. Conseqüentemente o estudo proteômico delas não seria comparável ao do endométrio típico (77).

As principais técnicas utilizadas em pesquisas sobre proteômica e endometriose têm sido a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massas. O principal desafio no estudo da proteômica é na obtenção de amostras reprodutíveis. As técnicas de eletroforese devido às suas limitações têm sido substituídas por técnicas de espectrometria de massas em larga escala, que permitiram a identificação e quantificação de proteínas de menor

abundância envolvidas em doenças (46). A espectrometria de massas foi descrita com vantagens na velocidade, sensibilidade e especificidade (67). A proteômica baseada em espectrometria de massas tem sido proposta em vários estudos na área de ginecologia em câncer de ovário, endométrio, colo de útero e mama, doença trofoblástica gestacional, pré - eclâmpsia, infertilidade e endometriose (70). Na última década, melhorias nas técnicas de espectrometria de massas aumentaram a capacidade de análise direta de amostras complexas, sem a necessidade de tratamento prévio de amostras (78). A possibilidade do estudo direto das amostras em espectrômetros de massas tem oferecido maior precisão, sensibilidade e acurácia para os estudos em proteômica e biomarcadores (66).

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo, analisar a expressão quantitativa de proteínas do endométrio eutópico, comparando pacientes com endometriose profunda intestinal e grupo controle, por técnica *shotgun* de espectrometria de massas.

3. MÉTODO

3. PACIENTES E MÉTODO

3.1 Local de estudo e pacientes

O estudo foi realizado no **Setor de Endometriose da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP)**, onde foram recrutadas as participantes para o grupo com diagnóstico de endometriose, em colaboração com as seguintes instituições:

Maternidade Escola Assis Chateaubriand da Universidade Federal do Ceará (UFC): onde foram recrutadas as participantes para o grupo controle;

Laboratório de Proteômica do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC): onde foram realizadas o preparo das amostras para análise em espectrometria de massas;

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas- LBPQ da Universidade de Brasília (UnB): onde foram realizadas a análise do perfil de proteínas e dos resultados estatísticos.

Laboratório de Imunologia, Instituto do Coração (InCor), do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP): onde foram realizadas análises funcionais dos resultados obtidos com software de bioinformática.

As pacientes foram divididas em dois grupos principais: endometriose intestinal do retossigmoide (pacientes com confirmação cirúrgica e histológica) e controles saudáveis (pacientes sem endometriose).

As pacientes foram previamente informadas sobre o estudo, e o material foi coletado após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexos B, C e D**). A coleta das amostras respeitou os princípios éticos, práticos e de biossegurança estipulados pelo Ministério da Saúde e pelas

Comissões de Ética em Pesquisa com Seres Humanos das instituições. O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética das instituições sob os pareceres de nº 1.015.450/15 e nº 2.257.051/ 17 (**Anexos E e F**).

3.1.1 Número de paciente estudados

Trata-se de amostra consecutiva de total de 24 pacientes (grupo caso e controle), que procederam a cirurgia laparoscópica para endometriose intestinal no período de Abril de 2015 a Dezembro de 2016; e laqueadura tubária entre Agosto de 2016 a Março de 2017.

O número total de pacientes foi determinado pelo número de procedimentos cirúrgicos realizados durante o período de tempo estipulado. A amostra consecutiva foi validada pela escassez de estudos para comparação, impossibilitando outro tipo de análise para obtenção do tamanho da amostra.

3.1.2 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão para o grupo de pacientes com endometriose foram:

- idade entre 18 e 45 anos;
- endometriose profunda intestinal do retossigmóide comprovada cirúrgica e histologicamente;
- ciclos menstruais eumenorréicos com o intervalo entre os ciclos variando de 26 a 34 dias (Bastos, 1994);
- não utilização de terapêutica hormonal nos três meses que antecederem a cirurgia, incluindo análogos de GnRH, contraceptivos hormonais orais ou injetáveis, combinados ou progestagênios.

Os critérios de inclusão para as pacientes do grupo controle foram os mesmos considerados para as pacientes com endometriose, exceto para a presença da doença. Selecionaram-se mulheres com desejo de esterilização cirúrgica definitiva através de laqueadura tubária por videolaparoscopia e previamente aprovadas para o procedimento, respeitando-se as normas que

constam da Lei N°9.263 de 12 de janeiro de 1996, que regula o § 7º do art.226 da Constituição Federal.

3.1.3 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão para ambos os grupos de pacientes, com endometriose e controle sem endometriose foram:

- presença de afecção clínica aguda ou crônica ou qualquer patologia, associada ou não ao endométrio;
- presença de doenças imunológicas, endocrinológicas, ou câncer, comprovadas por anamnese, exame físico e laboratorial quando necessário.

No grupo controle sem endometriose, foram excluídas ainda pacientes que apresentassem toda e qualquer anormalidade anatômica ou afecção pélvica durante o procedimento de laqueadura tubárea.

3.1.4 Dinâmica do estudo

Todas as pacientes incluídas responderam a um questionário (**Anexo G**), que avaliou a presença dos sintomas típicos da doença (dismenorréia, dor pélvica crônica, dispareunia de profundidade, alteração intestinal cíclica, alteração urinária cíclica e infertilidade), uso de medicações e comorbidades. Foram realizados exames físico e de imagem (ultrassonografia transvaginal e /ou ressonância magnética da pelve) de acordo com a indicação clínica.

As pacientes do grupo endometriose apresentavam queixas clínicas da doença, e exames de imagem que indicavam a presença de endometriose profunda intestinal do retossigmóide, infiltrando no mínimo a camada muscular própria intestinal. Indicou-se a cirurgia para os casos de falha do tratamento clínico.

As pacientes do grupo controle não apresentavam queixas clínicas, excluiu-se qualquer anormalidade pélvica após exames de imagem, e

apresentavam desejo de esterilização cirúrgica definitiva por laqueadura tubária.

Ambos os grupos tiveram coletadas amostras de endométrio tópico no início das cirurgias, após o procedimento anestésico e sua datação comprovada histologicamente para a fase do ciclo.

Os dados cirúrgicos foram levantados do prontuário eletrônico, bem como o estágio da doença pela classificação da *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM, 1996) (**Anexo A**), resultado do exame histopatológico da lesão intestinal profunda da endometriose, e confirmação da fase do ciclo menstrual.

As amostras foram processadas no Laboratório de Proteômica do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC) e a análise do perfil de proteínas e dos resultados estatísticos no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas- LBPQ da Universidade de Brasília (UnB). As análises funcionais dos resultados obtidos com software de bioinformática foram realizadas no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

3.2 Coleta de amostras

Foram coletadas biópsias de endométrio tópico de pacientes do grupo com endometriose profunda intestinal do retossigmoide e do grupo controle no início das cirurgias com auxílio de catéter de aspiração de 1,5mm de diâmetro *Pipelle de Cornier* (CooperSurgical®) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e armazenadas em freezer a -80°C.

3.3 Extração de proteínas

Todas as amostras de tecido foram submetidas a pesagem, maceração em nitrogênio líquido e solubilização em solução de tampão de bicarbonato de trietilamônio 0,02M (TEAB) (Sigma-Aldrich, EUA) na proporção de 100mg /

200ul, contendo inibidor de protease (Sigma-Aldrich, EUA) na proporção de 1:1000; pH 8,5. As amostras foram centrifugadas a 9.000g por 15 min para obter sobrenadante, e o *pellet* (debris) foi descartado. A quantificação protéica do sobrenadante foi medida em triplicata através da técnica de Bradford (Bradford, 1976) em microplacas. Espécimes de 30ug de proteínas foram selecionados em tubos de Eppendorf LoBind para digestão das proteínas.

3.4 Digestão de proteínas

As amostras secas em Speed Vac® foram ressuspensas em Solução de TEAB 0,02M, Ureia 8M e DTT (Ditiotreitol) 0,05M (pH 7,9) e incubadas por 25 minutos a 55°C e 400rpm. Sob abrigo de luz e após resfriamento, foi adicionada solução de IAA 0,5M (Iodoacetamida) suficiente para atingir concentração final de 0,014M e incubou-se novamente por 40 min a 21°C e 400rpm. Posteriormente foi adicionada Solução de DTT 0,5M para atingir a concentração final de 0,005M.

As amostras foram diluídas na razão 1:5 com solução de TEAB 0,02M (pH 7,9), considerando a adição de solução de CaCl₂ (Cloreto de Cálcio) 0,1M suficiente para atingir a concentração final de 0,001M, e a adição de Tripsina (Promega) na razão 1:50 (1parte de tripsina para 50 de proteína). Em seguida, as amostras foram encubadas por 13h a 37°C e 300rpm, e após o período de digestão e resfriamento, foi adicionada solução de TFA (ácido trifluoroacético) 20% para atingir a concentração final de 1%.

3.5 Dessalinização peptídica

Em ponteiros P200, foram contruídas colunas “*home made*” de fase reversa utilizando discos Empore™ SPE C18 (Sigma-Aldrich, EUA).

Para o preparo da coluna, foram realizadas sequências de centrifugação a 1.000g por 3 minutos com Metanol 100%, seguido de Solução de Acetonitrila 80% e Ácido Acético 0,5%, e por fim Solução de Ácido Acético 0,5%.

Finalmente, as amostras foram adicionadas à coluna, centrifugadas a 900g durante 4 min e dessalinizadas duas vezes com Solução de Ácido acético 0,5% a 1.000g por 3 minuto.

A eluição dos peptídeos foi realizada em gradiente de Acetonitrila (25%, 50%, 80% e 100%), mantendo a concentração de Ácido Acético a 0,5% nas soluções, com centrifugações lentas de 600g durante 3 min e eppendorfs de coleta do tipo LoBind.

A quantificação peptídica pré-análise por espectrometria de massas foi realizada através da plataforma Qubit™ (Thermo Fisher, EUA) (**Figura 2**).

Fonte: Myung L, 2017.

Figura 2- Plataforma Qubit™ (Thermo Fisher, EUA) para quantificação peptídica.

3.6 Espectrometria de massas

As amostras foram analisadas seguindo uma abordagem espectrométrica de massa *label-free* de DDA (aquisição dependente de dados) utilizando o instrumento Orbitrap Elite (Thermo Fisher, EUA) (**Figura 3**).

FONTE: Thermofischer.com 2019

Figura 3- Espectrômetro de massas híbrido Thermo Scientific Orbitrap Elite®, combina o espectrômetro de massas ion trap de dupla pressão com analisador de massa Orbitrap TM de alto campo. O sistema oferece resolução de alta sensibilidade, e velocidade de varredura (Thermo Scientific).

Foram injetados 3µg da mistura de peptídeos numa coluna com 2cm x 100µm contendo partículas C18, 5µm. Os peptídeos foram eluídos desta coluna para outra (32cm x 75µm) contendo partículas C18, 3µm e finalmente eluídas para a fonte de ionização do espectrômetro de massa. O gradiente de eluição foi composto de ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila 2 a 35% durante 155 minutos. As frações eluídas geraram espectros de MS1 a uma resolução de 120000 entre 300-1650 m/z. Os doze íons mais abundantes de MS1 com cargas maiores do que dois foram automaticamente selecionados para uma segunda fragmentação (MS2) por dissociação de colisão de energia mais alta (HCD) com um controle de ganho automático (AGC) de 1×10^6 e exclusão dinâmica de 10ppm para 90 segundos. A janela de isolamento HCD (dissociação colisional de energia) foi definida para 2,0 m/z, com 5×10^4 AGC (ganho de controle automático), energia de colisão normalizada de 35% e limiar para detecção de 3000.

3.7 Delineamento experimental e análise dos dados

Os espectros de MS1 foram alinhados de acordo com a área de intensidade integrada dos picos gerados pelo respectivo íon, utilizando o software Progenesis Q1 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). A identificação de proteínas foi realizada utilizando o software PEAKS (versão 7.0; Bioinformatics Solutions, Waterloo, Ontário, Canadá), que deduz sequências de fragmentação de informação e pesquisa as bases de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e UniProt. A informação de identificação da proteína foi reinserida no programa Progenesis Q1 e combinada com dados previamente gerados quantitativamente. A normalização pela mediana foi conduzida, seguida da análise de variância (anova) e teste t simples para avaliar a significância estatística em $p < 0,05$. Para selecionar os eventos mais marcantes, a Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada com o agrupamento pelos valores de k-means (Queiróz et al. 2014).

Amostras do endométrio de indivíduos do grupo controle e pacientes com endometriose foram divididas em cinco grupos de comparação experimental, usando a análise do software Progenesis Q1 de acordo com o estágio da endometriose e a fase do ciclo menstrual:

1) Controle *versus* endometriose: análise quantitativa de proteínas entre os dois grupos na comparação geral, não distinguindo entre fase menstrual ou estágio da doença;

2) Controle na fase proliferativa *versus* endometriose estágio II na fase proliferativa;

3) Controle na fase proliferativa *versus* endometriose estágio IV na fase proliferativa;

4) Controle na fase secretora *versus* endometriose estágio II na fase secretora;

5) Controle na fase secretora *versus* endometriose estágio IV na fase secretora.

Os peptídeos foram considerados significativamente alterados entre os dois grupos de amostras para valores de $p < 0,05$ e fold-change $\geq 1,5$.

A análise estatística dos dados clínicos das pacientes de ambos os grupos foram conduzidos por Teste Exato de Fisher, Teste qui-quadrado de Pearson e Teste-t.

O programa STRAP (Software Tool for Rapid Annotation of Proteins, Boston, MA) foi usado para analisar a distribuição de componentes celulares entre as proteínas de acordo com os termos de ontologia fornecidos pelo GOA ("*Gene Ontology Annotation*"), e pareou o resultado das análises com uma lista de proteínas presentes na base de dados UniProt (Apweiler et al., 2004).

O software Ingenuity Pathway Analysis System (IPA; *Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA*) foi utilizado para análise das proteínas diferencialmente expressas entre os cinco grupos experimentais, das redes de interação protéica e sua interpretação molecular, biológica e funcional. Os

valores de p foram calculados usando o teste exato de Fisher, considerados significativos para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação clínica

Foram incluídas um total de 24 pacientes no estudo. Para o grupo com endometriose intestinal foram analisadas amostras de endométrio de 14 pacientes. Foram realizadas 43 cirurgias para endometriose intestinal no período estipulado para as coletas, das quais foram excluídas um total de 27 pacientes não elegíveis aos critérios desse estudo, e outras 2 por apresentarem quantificação peptídica insuficiente ($<3\mu\text{g}$ da mistura de peptídeos) para o protocolo de espectrometria de massas (**Figura 4**).

Para o grupo controle, foram incluídas amostras de endométrio de 14 pacientes, das quais foram excluídas 4 pacientes por quantificação peptídica mínima insuficiente ($<3\mu\text{g}$ da mistura de peptídeos) para análise *shotgun*, resultando em um total de 10 amostras (**Figura 4**).

Dados clínicos, de fase do ciclo menstrual e estágio de doença (ASRM, 1996) para ambos os grupos estão representados na Tabela 1. Não houveram diferenças significativas na idade, índice de massa corporal e fase do ciclo menstrual entre os indivíduos. Cinquenta por cento das pacientes com endometriose intestinal profunda foram classificadas no estágio II, e 50% no estágio IV da doença. Os sintomas relacionados à endometriose (dismenorréia severa 0,0% vs 85,7%, dispareunia de profundidade 0,0% vs 57,1%, sintomas cíclicos intestinais 0,0% vs 50% e infertilidade 0,0% vs 85,7%) diferiram significativamente entre os grupos controle e endometriose ($p < 0,05$) (**Tabela 1**).

Figura 4- Fluxograma de pacientes do estudo

Tabela 1 - Dados clínicos, fase do ciclo menstrual e estágio de doença das pacientes incluídas no estudo nos grupos controle e endometriose

VARIÁVEL	GRUPO, n (%)		Total	P
	Controle (n=10)	Endometriose (n=14)		
Idade (anos) ± desvio padrão	33,1 ± 3,6	37,0 ± 5,9	24	0,08 ¹
IMC (Kg/m²) ± desvio padrão	25 ± 4,3	24,4 ± 3,6	24	0,73 ¹
Infertilidade				
Sim	0 (0,0)	7 (87,5)	7	<0,001 ²
Não	10 (100,0)	1 (12,5)	11	
Dismenorréia severa (EVA>7)				
Sim	0 (0,0)	12 (85,7)	12	<0,001 ³
Não	10 (100,0)	2 (14,3)	12	
Dispareunia de profundidade				
Sim	0 (0,0)	8 (57,1)	8	0,006 ²
Não	10 (100,0)	6 (42,9)	16	
Dor pélvica acíclica				
Sim	0 (0,0)	5 (35,7)	5	0,053 ²
Não	10 (100,0)	9 (64,3)	19	
Sintomas intestinais cíclicos				
Sim	0 (0,0)	7 (50,0)	7	0,019 ²
Não	10 (100,0)	7 (50,0)	17	
Sintomas urinários cíclicos				
Sim	0 (0,0)	3 (21,4)	3	0,239 ²
Não	10 (100,0)	11 (78,6)	21	
Fase do ciclo menstrual				
Proliferativa	5 (50,0)	8 (57,1)	13	0,999 ²
Secretora	5 (50,0)	6 (42,9)	14	
Estádio da Endometriose (ASRM)				
I	0	0	0	
II	0	7	7	
III	0	0	0	
IV	0	7	7	

Dados expressos como média ± desvio padrão.

¹Teste-t Student.

²Teste exato de Fisher.

³Teste qui-quadrado de Pearson (p<0,05).

4.2 Análise de proteínas

4.2.1 Identificação de proteínas diferencialmente expressas no endométrio

A análise proteômica do tecido endometrial realizada com o software Progenesis® (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, Reino Unido) resultou em um perfil de 595 proteínas diferencialmente expressas entre os grupos controle e endometriose, nas diferentes fases da doença, e do ciclo menstrual (*fold-change* > 1,5, análise de variância $p < 0,05$) (**Anexos H, I, J, K, L - Tabelas S1 a S5**).

4.2.2 Análise biológica e funcional das proteínas por *softwares* de bioinformática

As **tabela 2** apresenta as principais moléculas diferenciais resultantes da comparação quantitativa de proteínas entre grupos, e os principais processos associados às mesmas, de acordo com o *software* IPA.

Tabela 2 - Principais proteínas com expressão aumentada no grupo endometriose

Proteínas com expressão aumentada	Razão de expressão (<i>fold-change</i>)	Categorias de doenças e de função molecular
SETSIP	3,4	angiogênese, diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas por proteínas (PIPS) em células endoteliais, indução da transcrição da expressão da endotelial-caderina vascular (ve-caderina)
SRRM2	3,3	câncer, splicing de RNAm, endocitose
CAPS	3,0	ligação ao íon cálcio, perda recorrente da gravidez, metástase do câncer de pulmão, câncer de esôfago, câncer colorretal, carcinoma endometrial
H2AFV	2,9	câncer de mama, câncer de bexiga
SAFB	2,5	morfologia celular, montagem e organização celular, desordens do tecido conjuntivo

Continua

Conclusão da Tabela 2 - Principais proteínas com expressão aumentada no grupo endometriose

Proteínas com expressão aumentada	Razão de expressão (fold-change)	Categorias de doenças e de função molecular
CTTN	2,1	sinalização de integrinas, sinalização de endocitose mediada por clatrina, síntese de espécies reativas de oxigênio, carcinoma de células escamosas, tumor gastrointestinal, transporte de moléculas, tumor geniturinário, tumor malar, migração de células, tumor de cabeça e pescoço
DYNLL2	2,2	autofagia, homeostase celular, câncer, câncer, processamento de mRNA, endocitose, degranulação de fagócitos, metabolismo de espécies reativas de oxigênio, carcinoma geniturinário, câncer colorretal, transporte de moléculas, carcinoma do trato genital feminino
HBB	2,0	infecção viral, organização da organela, polimerização de proteína, homeostase celular, processos mitóticos
CHMP2A	2,0	splicing de mRNA, síndrome auto-imune sistêmica, polimerização de proteína
RBMX	1,9	

FONTE: *Software Ingenuity Pathway Analysis System (IPA; Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA)*

A **tabela 3** se refere às proteínas diferencialmente expressas de acordo com a fase do ciclo menstrual e estágio da doença.

Tabela 3 - Principais proteínas com expressão reduzida no grupo endometriose

Proteínas com expressão reduzida	Razão de expressão (fold-change)	Categorias de doenças e de função molecular
BPIFB1	-39,1	resposta antimicrobiana
FAM184A	-29,9	proteína extracelular, função desconhecida
SLPI	-16,8	sinalização de receptores de glicocorticóides, câncer, degranulação de fagócitos, inflamação do trato gastrointestinal

Continua

Continuação da Tabela 3 - Principais proteínas com expressão reduzida no grupo endometriose

Proteínas com expressão reduzida	Razão de expressão (fold-change)	Categorias de doenças e de função molecular
PIGR	-14,0	inflamação de órgão, degranulação de neutrófilos, migração de leucócitos, glomerulonefrite auto-imune, crescimento anormal no endométrio, distúrbio inflamatório crônico, englobamento de células, migração de células, adesão de células epiteliais
JCHAIN	-9,5	câncer, endocitose, inflamação do trato gastrointestinal, câncer colorretal, tumor geniturinário, migração de leucócitos, resposta antibacteriana, polimerização de proteínas, migração de células
HLA-A	-5,9	via de sinalização de neuroinflamação, papel de NFAT na regulação da resposta imune, via de ativação th1 e th2, via de sinalização de exaustão de células t, sinalização de pkcθ em linfócitos t, sinalização cd28 em células t auxiliares, sinalização cdc42, sinalização icos-icosl em células auxiliares t , crosstalk entre células dendríticas e células natural killer, diferenciação celular t-helper, via de apresentação de antígenos, maturação de fagossomas, comunicação entre células imunes inatas e adaptativas, desenvolvimento de células b, câncer, câncer colorretal, câncer genitorunar, doenças autoimunes sistêmicas, lúpus eritematoso sitêmico, doenças reumáticas
LTF	-5,3	produção de espécies reativas de oxigênio, câncer gastrointestinal, doença crônica, câncer, lúpus eritematoso, inflamação do trato gastrointestinal, câncer colorretal, tumor geniturinário, tumor malar, distúrbio inflamatório crônico, crescimento de bactérias, resposta antibacteriana, atraso no início da apoptose do sangue periférico neutrófilos, doença reumática
SF3A3	-3,9	splicing de RNAm
RUFY2	-3,8	câncer, endocitose, carcinoma geniturinário, englobamento de células,

Continua

Conclusão da Tabela 3 - Principais proteínas com expressão reduzida no grupo endometriose

Proteínas com expressão reduzida	Razão de expressão (fold-change)	Categorias de doenças e de função molecular
IGHG1	-3,7	maturação de células dendríticas, via de sinalização da IL-7, comunicação entre células imunes inatas e adaptativas, sinalização autoimune da doença da tireoide, inflamação do trato gastrointestinal, inflamação do órgão, ativação do complemento, desordem inflamatória crônica, síndrome autoimune sistêmica, migração de células, doença reumática, invasão de linhagens de células endoteliais, migração de células mesenquimais

FONTE: *Software Ingenuity Pathway Analysis System (IPA; Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA)*

Nas **tabelas 4 e 5**, as proteínas com diferenciais em sua expressão no grupo endometriose foram distribuídas de acordo com a fase do ciclo menstrual e estágio da doença.

Tabela 4 - Principais proteínas diferencialmente expressas no grupo endometriose (estádio II), de acordo com fase do ciclo menstrual

Fase menstrual	Expressão aumentada	Razão de expressão (fold-change)	Expressão reduzida	Razão de expressão (fold-change)
Proliferativa	EEF2	140,3	MUC5AC	-72,4
	S100P	33,1	FCGBP	-42,7
	PYGL	7,4	LTF	-32,8
	HSPA5	6,6	CPM	-15,1
	GDA	6,3	RPL13	-8,8
	KRT8	5,8	SERPINA1	-7,7
	VPS29	3,8	SERPINA3	-5,0
	HADHA	3,4	ALB	-3,0
	LTA4H	3,4	CLEC3B	-1,6
	MGA	3,4	SERPING1	-2,6
	FLNA	207,2	APOA2	-34,9
	EEF1G	129,0	PSMA2	-18,9
	RPLP2	125,7	LCP1	-9,4
	YBX1	68,4	SAMHD1	-8,9
Secretora	OGN	43,1	FGA	-8,8
	RPS3	38,2	CA1	-8,3
	NUCKS1	34,2	HPX	-7,5
	KRT19	33,6	GLRX	-4,9
	HMGB2	33,2	APOA1	-3,9
	USO1	32,2	CAT	-3,9

FONTE: *Software Ingenuity Pathway Analysis System (IPA; Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA)*

Tabela 5 - Principais proteínas diferencialmente expressas no grupo endometriose (estádio IV), de acordo com fase do ciclo menstrual

Fase menstrual	Expressão aumentada	Razão de expressão (fold-change)	Expressão reduzida	Razão de expressão (fold-change)
Proliferativa	CHMP4B	145,2	PAEP	-18,2
	DES	72,0	ALB	-6,1
	MATR3	59,0	APOA4	-2,6
	ECH1	58,5	C3	-1,4
	EIF3I	53,2		
	CDH13	49,0		
	LIMS1	48,2		
	POTEG	42,3		
	UBE2F	38,0		
	CD99	30,2		
Secretora	HSPA4	81,6	C3	-131,4
	HSP90AB1	61,3	VCP	-99,2
	SRP14	51,0	DNAJC3	-87,7
	TUBB	40,4	PIGR	-36,6
	SPTB	35,0	CP	-15,4
	MYL6	34,7	BPGM	-6,5
	GAPDH	33,3	IGHA2	-4,6
	NPM1	28,7	TF	-4,2
	KRT1	25,2	IGHG1	-4,1
	KRT9	10,2	ATP5F1B	-2,6

FONTE: *Software Ingenuity Pathway Analysis System (IPA; Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA)*

O programa STRAP foi utilizado para analisar a distribuição das proteínas nos diferentes componentes celulares. As proteínas diferencialmente expressas entre os grupos apresentaram localização preferencial no citoplasma e no núcleo para proteínas com expressão reduzida na endometriose. Para as proteínas com expressão aumentada, estas estavam localizadas em sítios extracelulares de acordo com a análise do *software* (**Gráfico 1**).

Gráfico 1 - Comparação entre grupos de proteínas diferencialmente expressas em endométrio de pacientes com endometriose (categoria por localização celular).

Os resultados foram posteriormente submetidos à análise com *software* de bioinformática Ingenuity Pathway Analysis System (IPA; Ingenuity Systems, Redwood City, CA, EUA). A análise das vias canônicas das proteínas entre os grupos endometriose (n = 14) e controle (n = 10) foram realizadas. As vias canônicas mais importantes do ponto de vista funcional foram relacionadas à sinalização de resposta de fase aguda, à via de sinalização da homeostase de ferro, sinalização de endocitose mediada por clatrina, ativação LXR (receptor X hepático)/ XR (receptor X) e ativação de FXR (receptor X farsenóide) / RXR (receptor X retinóide) (**Gráfico 2**).

Gráfico 2 - As vias canônicas mais significativas nas pacientes com endometriose, de acordo com a análise do *software* Ingenuity Pathway Analysis (IPA). O gráfico de barras exibe a porcentagem de proteínas identificadas em cada via funcional. O valor de p foi calculado usando o teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

As principais doenças e distúrbios associados às proteínas diferenciais entre os grupos foram relacionadas ao câncer (39 moléculas, faixa de valor de p $4,14E-02 - 3,91E-08$); lesão orgânica e anormalidades (46 moléculas, faixa de valor de p $4,45E-02 - 3,91E-08$); e doenças gastrointestinais (25 moléculas, faixa de valor p $4,45E-02 - 3,32E-06$). As principais proteínas tiveram associação funcional com mecanismos de manutenção celular (22 moléculas, faixa de valor- P $4.45E-02-3.78E-06$), montagem e organização celular (15 moléculas, faixa de valor- P $4.45E-02-7.79E-06$), e sistema imunológico (8 moléculas, intervalo de valores de p $4,06E-02 - 4,46E-04$).

A análise de interação molecular foi realizada com o *software* IPA. As redes relacionadas às diferentes fases do ciclo menstrual e estádios de endometriose estão representadas no **Anexo M (Tabela S6)**.

A **Figura 5a** representa as principais interações de proteínas diferencialmente expressas no grupo endometriose em comparação ao grupo controle. **As figuras 5b e 5c** representam a interação de proteínas diferencialmente expressas na forma grave da endometriose (estádio IV), nas fases menstruais proliferativa e secretora respectivamente.

a

Figura 5a - Análise das principais interações de proteínas diferencialmente expressas no grupo endometriose em comparação ao grupo controle pelo *software* IPA (IPA; *Ingenuity Systems, Redwood City, CA, EUA*). As proteínas da rede são mostradas na graduação das cores vermelha e verde, com base na sua mudança na expressão. A cor vermelha representa moléculas com expressão aumentada, e a cor verde corresponde à expressão reduzida na endometriose. As formas brancas representam moléculas não identificadas na análise, mas que estão associadas à regulação de algumas das proteínas identificadas. Uma linha denota ligação entre proteínas. Uma linha pontilhada mostra uma interação indireta.

b

Figuras 5b - Análise das principais interações de proteínas diferencialmente expressas na forma grave da endometriose (estádio IV), e na fase menstrual proliferativa, pelo *software* IPA (IPA; *Ingenuity Systems, Redwood City, CA, EUA*). As proteínas da rede são mostradas na graduação das cores vermelha e verde, com base na sua mudança na expressão. A cor vermelha representa moléculas com expressão aumentada, e a cor verde corresponde à expressão reduzida na endometriose. As formas brancas representam moléculas não identificadas na análise, mas que estão associadas à regulação de algumas das proteínas identificadas. Uma linha denota ligação entre proteínas. Uma linha pontilhada mostra uma interação indireta.

c

Figura 5c - Análise das principais interações de proteínas diferencialmente expressas na forma grave da endometriose (estádio IV), e na fase menstrual secretora, pelo software IPA (IPA; *Ingenuity Systems, Redwood City, CA, EUA*). As proteínas da rede são mostradas na graduação das cores vermelha e verde, com base na sua mudança na expressão. A cor vermelha representa moléculas com expressão aumentada, e a cor verde corresponde à expressão reduzida na endometriose. As formas brancas representam moléculas não identificadas na análise, mas que estão associadas à regulação de algumas das proteínas identificadas. Uma linha denota ligação entre proteínas. Uma linha pontilhada mostra uma interação indireta.

A análise dos principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas na endometriose, para as diferentes fases do ciclo menstrual e estádios, estão especificadas nos **Anexos N, O, P, Q (Tabela S7 a S10)**

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

As análises proteômicas do endométrio tópico tem sido descritas recentemente em estudos sobre endometriose. Esses estudos têm demonstrado que a expressão protéica do endométrio tópico está modificada em pacientes com endometriose (56), (73). A maioria desses estudos têm utilizado técnicas de eletroforese e mais recentemente, métodos de espectrometria de massas com identificação direcionada das proteínas (análises *targeted*) (62), (75). Este estudo piloto foi o primeiro a avaliar diferenças quantitativas na expressão protéica do endométrio tópico de pacientes com endometriose profunda intestinal, por meio de técnica proteômica *shotgun* de espectrometria de massas.

As principais descobertas do nosso estudo foram de que as proteínas expressas no endométrio tópico de pacientes com endometriose profunda intestinal mostraram um painel molecular relacionado ao câncer, a maioria das quais ainda não haviam sido previamente relacionados à endometriose. Observou-se que a expressão protéica entre as fases do ciclo menstrual e estádios da doença apresentou diferenças, mas todas as moléculas foram comuns em apresentar um painel de proteínas relacionadas ao câncer.

Ao estudarmos as proteínas com expressão aumentadas na fase proliferativa de pacientes com endometriose no estágio II, observamos que o EEF2 (Eukaryotic Translation Elongation Factor 2) apresentou *fold-change* de expressão de 140,3. Esta proteína participa da regulação da síntese de proteínas e tem sido descrita na progressão de vários tipos de cânceres (79), (80). A EEF2 promove a proliferação de células tumorais, maior predisposição à invasão, metástases e pior prognóstico no câncer de ovário (81) e no câncer hepatocelular (82). Na mesma fase do ciclo e estadiamento, observamos que a S100P apresentou *fold-change* de expressão de 33,1. S100P é uma proteína de ligação ao cálcio com funções intracelulares e extracelulares. Tem sido descrita em muitos cânceres e está associada a metástase e a mal prognóstico (83). Hapangama et al. observou que a expressão de S100P poderia induzir a metástase e aumentar a invasividade da célula endometrial, o que poderia

explicar sua maior expressão em pacientes com endometriose (84). Além do S100P, a HSPA5, KRT8 e MGA foram encontrados com expressão aumentada nas pacientes com endometriose com *fold-change* de expressão de 6,6, 5,8, 3,4 respectivamente. Estas têm sido descritas associadas a vários tipos de cânceres (85), (86), como os de mama, ovário, gástrico, colorretal, fígado e pulmão (87), (88). Estes achados podem estar relacionados com estudos anteriores em que a endometriose têm sido associada a um risco aumentado para câncer de ovário de células claras, e epitelial endometrióide (89). Estudos também tem descrito uma maior correlação entre endometriose e câncer de mama (90).

Considerando as proteínas com expressão aumentadas na fase secretora de pacientes com endometriose no estágio II, observamos que a FLNA (Filamina A) apresentou *fold-change* de expressão de 207,2. Esta proteína está envolvida em funções de migração celular e adesão, e tem sido descrita como uma proteína promotora do câncer de mama, câncer melanoma e câncer de pulmão (91). Esses achados podem corroborar com estudos que têm correlacionado um maior risco de pacientes com endometriose em desenvolver melanoma cutâneo (92). FLNA também tem sido encontrada com expressão aumentada em pacientes com câncer do colo do útero, e associada a metástase e menor sobrevida (93). Para o mesmo grupo de pacientes, a EEF1G (Elongation factor) apresentou *fold-change* de expressão de 129,0. EEF1G foi descrita como um preditor de mal prognóstico em câncer de mama e pulmão (94). Adicionalmente à EEF1G, a RPLP2 (proteína ribossomal, *fold-change* de expressão de 129,0) tem sido correlacionada com a presença de metástases em cânceres do tipo seroso de ovário, maior invasão miometrial em carcinomas de endométrio, e a maior incidência em carcinomas de mama (95). A YBX1 (nuclease-sensitive element-binding protein 1, *fold-change* de expressão de 68,4) está relacionada a maior resistência a fármacos no tratamento de tumores e metástases (96). Os níveis séricos de YBX1 já foram descritos com expressão aumentada em pacientes com endometriose comparado a pacientes controle (97). OGN, RPS3, NUCKS1, KRT19, HMGB2 e USO1 (*fold-change* de expressão de 43,1, 38,2, 34,2, 33,6 e 32,2 respectivamente) têm sido relacionados a vários tipos de câncer (98), (88),

(99). RPS3 e KRT19 foram descritos em processos de fibrogênese, e HMGB2 em angiogênese (100), (101). A expressão aumentada dessas moléculas em pacientes com endometriose pode estar relacionada a atividade aumentada de fibrose, e neoangiogênese já descritas na doença (102), (103).

Dentre as proteínas com expressão reduzida na fase proliferativa de pacientes com endometriose no estágio II, observamos que a MUC5AC (Mucin-5AC, *fold-change* de expressão de -72,4) foi descrita por ter uma expressão aumentada em adenocarcinoma de cólon, câncer de pâncreas, colangiocarcinoma e câncer de ovário (104), (105). FCGBP (IgGFc - binding protein, *fold-change* de expressão de -42.7), também foi descrita com expressão reduzida no câncer de cólon (106). LTF (lactotransferrina, *fold-change* de expressão de -32.8), foi descrita associada a cânceres (107), doença de Crohn (108) e expressão reduzida em câncer gástrico (109). LTF também foi detectada em baixas concentrações nos estádios iniciais da endometriose, em comparação com os estádios mais avançados da doença no estudo de Polak et al. (110). SERPINA3 (Alpha-1-antichymotrypsin, *fold change* de expressão de -5,0), foi descrita em estudo anterior, como uma proteína que possui expressão aumentada no endométrio em resposta a ação da gonadotrofina coriônica humana em condições normais. Esta se encontrou com expressão reduzida em modelos animais com endometriose, o que poderia explicar em parte a falha na implantação embrionária das pacientes com endometriose (111).

A APOA2 (apolipoproteína A-II, *fold-change* de expressão de -34,9), com expressão reduzida na fase secretora do ciclo menstrual e no estágio II da endometriose, mostrou-se com expressão reduzida também em pacientes com câncer de mama (112), e aumentada em câncer de pâncreas (113). A FGA (Fibrinogen Alpha Chain, *fold-change* de expressão de -8,8) tem atividade envolvida na apoptose de células de linhagem tumoral e na adesão de neutrófilos (114), (115), (116). Sua expressão reduzida encontrada em pacientes com endometriose no presente estudo poderia estar relacionada a menor atividade de apoptose, e menor resposta imunológica relacionada à doença. Este mecanismo já havia sido descrito no processo de falha de

reconhecimento do tecido endometrial ectópico na cavidade peritoneal, levando ao aumento da tolerância imunológica e persistência dos implantes de endometriose (56). Zhao et al. publicou um estudo em que identificou o FGA como um dos potenciais marcadores em soro de pacientes com endometriose (117)

Considerando as proteínas com expressão aumentada na fase proliferativa de pacientes com endometriose no estágio IV, observamos que a CHMP4B (Charged Multivesicular Body Protein 4b, *fold change* de expressão 145,9) foi descrita com expressão aumentada em carcinoma hepatocellular (118). DES (Desmina, *fold-change* de expressão de 72,0), foi relacionada em estudos associada ao câncer colorretal, câncer hematológico e câncer de endométrio (119), (120). Foi considerada um marcador de diferenciação fibromuscular e de células musculares lisas em pacientes com endometriose profunda em estudo de van Kaam et al. (121). A expressão aumentada dessa proteína em pacientes deste estudo poderia estar relacionada com o fato das lesões de endometriose profunda intestinal apresentarem reação de fibrose e metaplasia muscular ao redor de seu componente histológico estromal em aproximadamente 80% dos casos (76). EIF3I (Eukaryotic Translation Initiation Factor 3, subunit 1, *fold-change* de expressão de 53,2), é altamente expressa em células endoteliais durante a angiogênese embrionária e tumoral, tendo sido descrita em metástases linfonodais, na invasão do câncer de ovário, na maior incidência de estágio avançados dos cânceres gástrico e hepatocelular (122), (123). A expressão aumentada dessa proteína pode estar relacionada aos achados de Abrão et al. que constataram que os linfonodos são afetados por focos de endometriose em pacientes com endometriose intestinal profunda (124) Quanto mais profunda a lesão intestinal, maior o comprometimento linfonodal encontrado no estudo (13). Alguns estudos sugeriram que a EIF3I poderia ser utilizada para terapia-alvo antineoplásica (123). CDH13 (caderina-13, *fold-change* de expressão de 49,9), é um gene supressor de tumor que desempenha um papel fundamental na adesão célula-célula. É expressa em células tumorais humanas e demonstrou inibir o potencial invasivo dos tumores, e reduzir acentuadamente a sua proliferação em alguns trabalhos (125), (126). Esse achado pode explicar uma maior capacidade de progressão

e invasão da endometriose em estádios mais avançados. LIMS1 (LIM and senescent cell antigen-like- containing domain protein 1, *fold-change* de expressão de 42,0), está associada à maior incidência tumoral, câncer do aparelho digestivo, câncer geniturinário, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer endometrial e neoplasia de cabeça e pescoço (127), (128), (129). Sua expressão aumentada foi associada a estádios mais avançados de neoplasias, e a pior prognóstico dos pacientes (130). O LIMS1 é crucial para a adaptação do tumor às condições de privação de oxigênio-glicose, e tem sido objeto de estudo como um promissor alvo terapêutico para o tratamento do câncer (131). A expressão aumentada dessa proteína em estádios mais avançados da endometriose neste estudo, pode estar relacionada ao mecanismo descrito anteriormente relacionado ao câncer, bem como uma possibilidade do desenvolvimento de terapias-alvo. A endometriose foi descrita relacionada ao aumento do risco de doença inflamatória intestinal e outras doenças inflamatórias e autoimunes (132). O CD99 (antígeno CD99), *fold-change* de expressão de 30.2, foi relacionado a vários tipos de cânceres (133), (134), (135), doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn e retocolite ulcerativa) e doença inflamatória autoimune, mostrando uma correlação positiva com a atividade da doença (136). O aumento da expressão desta proteína em pacientes com endometriose do presente estudo está congruente com a associação anteriormente descrita.

Dentre as proteínas com expressão aumentada na fase secretora de pacientes com endometriose no estágio IV, observamos que a HSPA4 (*Heat shock 70 kDa protein 4*, *fold-change* de expressão de 81,6) fazem parte da família das proteínas *heat shock* que possuem expressão aumentada em tecido de carcinoma hepatocelular humano, e foram relacionadas com a agressividade e pior prognóstico da doença (137), (138). A HSP90AB1 (*Heat shock protein HSP 90-beta*) *fold-change* de expressão de 61.3, pertence a um grande grupo de moléculas chaperones. Os chaperones mantêm a estabilidade da proteína após a exposição a vários tipos de estresse celular. Proteínas de choque térmico são relacionadas a regulação de processos de câncer (139). A expressão aumentada de HSP90AB1 tem sido descrita correlacionada com um pior prognóstico, proliferação e invasão do câncer gástrico, do melanoma e do

câncer de pulmão (140), (141). TUBB (Tubulina) e NPM1 (Nucleofosmina) *fold-change* de expressão de 40,4 e 28,7, estão relacionados com carcinoma endometrial, bem como de outros tipos de cânceres como o de colorectal, mama e ovário (142), (143), (144), (145). MYL6 (*Myosin light polypeptide 6*), GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), KRT1 (*Keratin, type II cytoskeletal 1*) e KRT9 (*Keratin, type I cytoskeletal 9*) *fold-change* de expressão de 34,7, 33,3, 25,2, 10,2 respectivamente. são diferencialmente expressos em cânceres do trato reprodutivo, fígado e mama (146), (147), (148), (149). O GAPDH também está relacionado a doenças degenerativas neurológicas (150).

Ao considerarmos as proteínas com expressão reduzida na fase proliferativa de pacientes com endometriose no estágio IV, observamos que a PAEP (glicodelina, *fold-change* de expressão de -18,2), está associada com uma maior incidência e frequência de tumores, tais como de pulmão, câncer de ovário e de endométrio, câncer de mama, cancer de pâncreas, adenocarcinoma e atividade de apoptose (151), (152), (153), (154). Mosbah et al. publicou um estudo em que níveis de glicodelina foi significativamente maior em fluido peritoneal e soro de pacientes com endometriose, e correlacionou-se positivamente com o estágio da doença (155). Os achados do presente estudo não encontrou resultados semelhantes.

Considerando as proteínas com expressão reduzida na fase secretora de pacientes com endometriose no estágio IV, observamos que a C3 (complemento C3, *fold-change* de expressão de -131.4), está relacionada ao câncer geniturinário, câncer de fígado, câncer colorretal, câncer de mama, câncer hematológico, câncer de mama e ovário, doença reumática, síndrome autoimune sistêmica e doença de Huntington (156), (157), (158), (159), (160). C3 foi descrito com expressão aumentada em epitélio endocervical de mulheres com endometriose profunda e pacientes com infertilidade em alguns estudos (161), (162). VCP (proteína contendo valosina) *fold-change* de expressão de -99,2, é um membro da família da proteína AAA + ATPase tipo II. A VCP atua em diversos processos celulares e tem sido correlacionada positivamente à proliferação e metástase do câncer colorretal (163). Com isso o estudo sugeriu que futuramente, a VCP poderia ser alvo de desenvolvimento

de terapia-alvo, em que a redução de sua expressão poderia ser usada para o tratamento do câncer colorretal (163). PIGR (receptor de imunoglobulina polimérica) *fold-change* de expressão de -36.6, é um membro da superfamília de imunoglobulinas. Sua expressão aumentada está associada a desfechos clínicos adversos e pior prognóstico em cânceres, tais como o de câncer de pulmão, câncer de pâncreas, gastroesofágico, de ovário, de bexiga e de cólon (164), (165), (166), (167). A expressão reduzida dessas proteínas em pacientes com endometriose profunda nos estádios avançados do presente estudo poderia estar relacionada a um possível melhor prognóstico de alguns dos tipos de cânceres supracitados.

Os resultados do presente estudo vão de encontro aos diversos estudos anteriores, em que se demonstrou que o endométrio eutópico de pacientes com endometriose é alterado (56), (73), podendo-se aventar a hipótese de que a doença se iniciaria no endométrio eutópico dessas pacientes. Uma maior expressão do fator de crescimento endotelial vascular em pacientes com endometriose intestinal profunda havia sido constatado em estudo anterior publicado por Machado et al. (102). May et al. publicaram uma revisão sistemática sobre potenciais biomarcadores no endométrio eutópico de pacientes com endometriose (56). Dentre os biomarcadores revisados estavam os fatores imunológicos, uma maior expressão de fatores de crescimento, e de adesão celular, bem como de moléculas relacionadas à neoangiogênese. Tais fatores encontrados no endométrio eutópico de pacientes com endometriose coincidem com as características (“*hallmarks*”) moleculares dos processos de câncer que têm sido descritas (168), e muitas delas apresentam vias em comum com a endometriose. Adicionalmente se encontram, a resistência a atividade de apoptose, a tolerância imunológica, e maior capacidade de invasão tecidual e potencial metastático (168).

Melin et al. avaliaram uma grande coorte de mulheres afetadas por endometriose e vários tipos de cânceres (169). Eles observaram um melhor prognóstico para câncer de mama e ovário, mas uma menor taxa de sobrevida para melanoma maligno (169, 170). Nossos resultados revelaram aumento da expressão de várias proteínas na endometriose relacionadas a um pior

prognóstico, e metástase em muitos tipos de cânceres. No entanto, algumas moléculas importantes tiveram expressão reduzida em pacientes com endometriose. Ao exemplo da VCP, PIGR e MUC5AC que estavam reduzidas nas pacientes com endometriose do presente estudo, foram descritas associadas ao câncer colorretal, câncer hepatocelular e colangiocarcinoma quando encontradas em expressão aumentada, e relacionadas a metástases e pior prognóstico (163),(167),(171). Esses achados podem explicar as diferenças na prevalência, e no prognóstico dos diversos cânceres entre pacientes com endometriose (170). A endometriose provavelmente representa uma parte de uma condição sistêmica de desregulação, predispondo a paciente ao câncer, a doenças autoimunes e inflamatórias crônicas.

Nossos achados foram os primeiros a empregar técnicas de proteômica *shotgun* para analisar proteínas diferencialmente expressas no endométrio eutópico de pacientes com endometriose intestinal profunda. A espectrometria de massas vem se tornando uma ferramenta importante em estudos de endometriose. Sua velocidade, sensibilidade, precisão e reprodutibilidade são potencializadas pelo advento de *softwares* de bioinformática para melhorar a análise dos dados resultantes. O rastreamento da endometriose por técnica de espectrometria de massas tem se tornado uma ferramenta analítica indispensável para a detecção de futuros biomarcadores.

Dos pontos fortes deste estudo, podemos considerar o fato do grupo controle ter sido selecionado totalmente saudável, excluindo-se qualquer outra doença pélvica ou clínica. A presença de condições clínicas ou de doença poderiam afetar as análises proteômicas, devido à alta sensibilidade desse método. Outra vantagem deste trabalho se deve a seleção homogênea de casos do grupo endometriose, apenas com endometriose profunda intestinal, excluindo-se outras anormalidades pévicas. Como limitações podemos considerar o número pequeno de amostras, em se tratando de um estudo piloto exploratório, necessitando-se portanto de validações futuras para cada um dos achados.

A endometriose é uma doença complexa e, conforme revelado neste estudo, o biomarcador para a doença se encontra futuramente validado em

painéis, em detrimento de um biomarcador único. O presente estudo revelou potenciais biomarcadores, que precisam ser validados no futuro em estudos maiores e promissores, para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas minimamente invasivas e de terapias-alvo para a endometriose.

6. CONCLUSÕES

6. Conclusões

As proteínas SETSIP, SRRM2, CAPS, H2AFV e SAFB tiveram expressão aumentada, enquanto que as proteínas BPIFB1, FAM184A, SLPI, PIGR, JCHAÍNA, HLA-A e LTF tiveram expressão reduzida no endométrio das pacientes portadoras de endometriose profunda intestinal.

Os resultados revelaram diferentes moléculas expressas de acordo com a fase do ciclo menstrual, e o estágio da doença. No entanto, a maioria das proteínas do presente estudo tiveram o câncer como principal doença associada.

As proteínas CHMP4B, DES, EIF3I, CDH13, LIMS1, HSPA4, HSP90AB1, TUBB, NPM1, MYL6 foram as principais que apresentaram expressão aumentada, e associada a estádios mais avançados da endometriose profunda intestinal e a cânceres de pior prognóstico.

7. ANEXOS

Anexo A- Estadiamento da endometriose proposto pela *American Society for Reproductive Medicine* em 1996

Estadiamento da endometriose ASRM (1996)				
ENDOMETRIOSE		<1cm	1–3 cm	> 3 cm
PERITÔNIO	Superficial	1	2	4
	Profunda	2	4	6
OVÁRIO D	Superficial	1	2	4
	Profunda	4	16	20
OVÁRIO E	Superficial	1	2	4
	Profunda	4	16	20
OBLITERACAO DO FUNDO DE SACO POSTERIOR		Parcial		Completa
		4		40
ADERÊNCIAS		<1/3 Envolvido	1/3–2/3 Envolvidos	> 2/3 Envolvidos
OVÁRIO D	Velamentosa	1	2	4
	Densa	4	8	16
OVÁRIO E	Velamentosa	1	2	4
	Densa	4	8	16
TROMPA D	Velamentosa	1	2	4
	Densa	4*	8*	16
TROMPA E	Velamentosa	1	2	4
	Densa	4*	8*	16

Estádio I (mínima): 1-5

Estádio II (leve): 6-15

Estádio III (moderada): 16-40

Estádio IV (severa): >40

*Se as fimbrias tubárias estiverem totalmente envolvidas por aderências, mude o escore para 16.

Porcentagem de implantes:

Lesões vermelhas (claras, vermelhas, rosadas, em chama, vesículas): __%

Lesões brancas (brancas, amareladas, marrons, defeitos de peritônio): __%

Lesões pretas (pretas, depósitos de hemossiderina, azuis): __%

Endometriose adicional: _____

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo controle HCFMUSP)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE No : SEXO : M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO No.....
APTO: BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO No.....
APTO: BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MARCADORES EM LESÕES DE ENDOMETRIOSE PROFUNDA PELA ABORDAGEM PROTEÔMICA".

PESQUISADOR: Prof.Dr.Maurício Simões Abrão.

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

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 52.842.

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA.

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO X RISCO MAIOR ☐

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____ Rubrica do pesquisador _____

Continua

**Continuação do Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
(grupo controle HCFMUSP)**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO-HCFMUSP**

1 – Estamos convidando a senhora para participação voluntária neste estudo e as informações a seguir estão sendo fornecidas para seu esclarecimento. Este estudo visa identificar proteínas que possam ser importantes para melhor entender o processo de como a endometriose se desenvolve como doença e melhorar as chances de detectar essa doença em exames. A endometriose é uma doença ginecológica que ocorre quando o tecido da parte interna do útero (endométrio) se espalha em outros órgãos e regiões do abdômen, tais como: ovário, intestino, bexiga e peritônio. Esta doença pode causar dores intensas no abdômen, principalmente cólicas no período menstrual, e dificuldade para engravidar, prejudicando muito a qualidade de vida das mulheres portadoras de endometriose.

2 – A senhora participará deste estudo após sua decisão igualmente voluntária de realização de laqueadura tubárea por cirurgia como método de contracepção definitiva após respeitado todo o processo de planejamento familiar que realizou anteriormente a sua participação neste estudo. Durante a cirurgia de laqueadura tubárea a participação nesse estudo será feita com a retirada de pequena amostra da parte interna do útero. Essas amostras retiradas serão analisadas no laboratório para estudar então as proteínas que estão envolvidas na endometriose.

3 – Não serão realizados procedimentos rotineiros de coleta de sangue ou de exames de radiologia.

4 – Não se espera que haja desconforto e riscos a mais durante e após a coleta de pequena amostra da parte interna do útero e nem para coleta de pequena amostra da parte do intestino com endometriose, o risco é apenas o que já existe da cirurgia.

5- A senhora não terá benefício direto nesta pesquisa. Trata-se de estudo experimental para identificar proteínas que possivelmente estejam envolvidas na endometriose. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício para a paciente com endometriose, ou seja, conhecer melhor a doença e posteriormente contribuir para a escolha do melhor tratamento.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____ Rubrica do pesquisador _____

Continua

**Continuação do Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
(grupo controle HCFMUSP)**

6 – Não há procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais a paciente possa optar.

7 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Professor Doutor Mauricio Simões Abrão que pode ser encontrado no endereço (Hospital das Clínicas - Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 – Divisão de Clínica Ginecológica, 10º andar, sala 10.166 – São Paulo/SP, Tel.(11) 2669-6647. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar, tel: (11)2661-6442, ramais 16, 17, 18 ou 20. FAX: (11)2661-6442 – ramal 26. E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br e cappesq@hcnet.usp.br.

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

9 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outras pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhuma paciente.

10 – A senhora poderá ter acesso aos resultados desta pesquisa no momento que achar necessário.

11 – A senhora não terá despesas adicionais ao participar da pesquisa, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

12 – Os dados obtidos e o material coletado serão utilizados somente para o estudo em questão.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____ Rubrica do pesquisador_____

Continua

Conclusão do Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo controle HCFMUSP)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MARCADORES EM LESÕES DE ENDOMETRIOSE PROFUNDA PELA ABORDAGEM PROTEÔMICA**".

Eu discuti com o Prof. Dr.Maurício Simões Abrão sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal:

Data / /

Assinatura da testemunha para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual:

Data / /

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____ Rubrica do pesquisador _____

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo endometriose-HCFMUSP)

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO No.....
APTO: BAIRRO:CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO No.....
APTO: BAIRRO:CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MARCADORES EM LESÕES DE ENDOMETRIOSE PROFUNDA PELA ABORDAGEM PROTEÔMICA".

PESQUISADOR: Prof.Dr.Maurício Simões Abrão.

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

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 52.842.

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA.

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO X RISCO MAIOR ☐

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____ Rubrica do pesquisador _____

Continua

**Continuação do Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
(grupo endometriose- HCFMUSP)**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO-HCFMUSP**

1 – Estamos convidando a senhora para participação voluntária neste estudo e as informações a seguir estão sendo fornecidas para seu esclarecimento. Este estudo visa identificar proteínas que possam ser importantes para melhor entender o processo de como a endometriose se desenvolve como doença e melhorar as chances de detectar essa doença em exames. A endometriose é uma doença ginecológica que ocorre quando o tecido da parte interna do útero (endométrio) se espalha em outros órgãos e regiões do abdômen, tais como: ovário, intestino, bexiga e peritônio. Esta doença pode causar dores intensas no abdômen, principalmente cólicas no período menstrual, e dificuldade para engravidar, prejudicando muito a qualidade de vida das mulheres portadoras de endometriose.

2 – A senhora apenas poderá participar deste estudo se a senhora tiver a endometriose intestinal e se a equipe de médicos que a acompanham a senhora dessa doença tiver decidido que seu tratamento terá que ser a cirurgia para retirada de parte do intestino onde se encontra a endometriose. Durante a cirurgia para tratar sua doença a participação nesse estudo será feita com a retirada de pequena amostra da parte interna do útero e de pequena parte do intestino que já será retirada para tratamento com a endometriose. Essas amostras retiradas serão analisadas no laboratório para estudar então as proteínas que estão envolvidas nessa doença.

3 – Não serão realizados procedimentos rotineiros de coleta de sangue ou de exames de radiologia.

4 – Não se espera que haja desconforto e riscos a mais durante e após a coleta de pequena amostra da parte interna do útero e nem para coleta de pequena amostra da parte do intestino com endometriose, o risco é apenas o que já existe da cirurgia.

5- A senhora não terá benefício direto nesta pesquisa. Trata-se de estudo experimental para identificar proteínas que possivelmente estejam envolvidas na endometriose. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício para a paciente, ou seja, conhecer melhor a doença e posteriormente contribuir para a escolha do melhor tratamento.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____ Rubrica do pesquisador _____

Continua

**Continuação do Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
(grupo endometriose- HCFMUSP)**

6 – Não há procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais a paciente possa optar.

7 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Professor Doutor Mauricio Simões Abrão que pode ser encontrado no endereço (Hospital das Clínicas - Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 – Divisão de Clínica Ginecológica, 10º andar, sala 10.166 – São Paulo/SP, Tel.(11) 2669-6647. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar, tel: (11)2661-6442, ramais 16, 17, 18 ou 20. FAX: (11)2661-6442 – ramal 26. E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br e cappesq@hcnet.usp.br.

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

9 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outras pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhuma paciente.

10 – A senhora poderá ter acesso aos resultados desta pesquisa no momento que achar necessário.

11 – A senhora não terá despesas adicionais ao participar da pesquisa, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

12 – Os dados obtidos e o material coletado serão utilizados somente para o estudo em questão.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____ Rubrica do pesquisador _____

Continua

Conclusão do Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo endometriose- HCFMUSP)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MARCADORES EM LESÕES DE ENDOMETRIOSE PROFUNDA PELA ABORDAGEM PROTEÔMICA**".

Eu discuti com o Prof.Dr.Maurício Simões Abrão sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal:

Data / /

Assinatura da testemunha para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual:

Data / /

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____ Rubrica do pesquisador _____

Anexo D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo controle – UFC)

Termo de Consentimento livre e Esclarecido

Você está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa intitulado IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES EM PACIENTES COM ENDOMETRIOSE PELA ABORDAGEM PROTEÔMICA, METABOLÔMICA, GENÔMICA E LIPIDÔMICA que tem por objetivo Identificar diferenças na expressão de substâncias dos fluidos e tecidos estudados de pacientes sem endometriose e com endometriose.

Você será submetida à investigação criteriosa através de anamnese, exame físico e exames de imagem (Ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal especializado para endometriose e/ou Ressonância Magnética de pelve se necessário), coleta do fluido menstrual e encaminhada para vídeo laparoscopia as pacientes que após tratamento clínico não apresentar resultado satisfatório, seguindo a rotina habitual do serviço.

No dia da cirurgia será anotado o dia do ciclo menstrual, sendo considerado como fase folicular do primeiro ao décimo quarto dia do ciclo e fase lútea do décimo quinto até o último dia do ciclo menstrual. Após os procedimentos anestésicos e o posicionamento, serão coletadas amostras de 10ml de sangue periférico, 10 ml de urina e coleta de endométrio com Pipelle, fluido peritoneal.

Os possíveis desconfortos podem ser: perfuração uterina pela manipulação com Novak ou Pipelle, desconforto na coleta de sangue periférico pelo acesso, dor e desconforto na coleta do sangue menstrual.

Não há benefício direto para o participante, pois trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que pode haver um biomarcador para diagnóstico precoce da endometriose. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício secundário. Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízo para seu tratamento na Instituição.

Continua

Conclusão do Anexo D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo controle – UFC)

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhuma paciente. Além disso, você será mantida atualizada sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

O pesquisador se compromete de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa e em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Kathiane Lustosa Augusto que pode ser encontrado no endereço: Maternidade Escola Assis Chateaubriand, Rua Coronel Nunes de Melo, s/n - Rodolfo Teófilo, Fortaleza - CE, 60430-270; telefone(s) 30673291.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUWC – Rua Capitão Francisco Pedro 1290, Rodolfo Teófilo; fone: 3366-8589 – E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br.

Caso você se sinta suficientemente informada a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se você concordar em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Anexo E - Parecer consubstanciado da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq- HCFMUSP)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MARCADORES EM LESÕES DE ENDOMETRIOSE PROFUNDA PELA ABORDAGEM PROTEÔMICA

Pesquisador: Mauricio Simões Abrão

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 07084114.0.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO
HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.015.450

Data da Relatoria: 08/04/2015

Apresentação do Projeto:

Projeto de Mestrado que será realizado com pacientes do Setor de Endometriose da Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em colaboração com o Laboratório de Estudos da Biologia do Trofoblasto no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. O estudo será prospectivo, visando a análise de diferenciação da expressão proteica em tecido tópico e ectópico de pacientes com e sem endometriose

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do estudo visa identificar diferenças na expressão de proteínas do endométrio tópico de pacientes sem endometriose, com endométrio tópico e ectópico de pacientes com endometriose profunda de retossigmóide, utilizando técnicas em proteômica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores, não há risco eminente da pesquisa, uma vez que se utilizarão materiais (fragmentos de endométrio) oriundos de cirurgias de rotina para tratamento de endometriose, no caso das pacientes e cirurgias de laqueadura tubária, no caso dos controles. Existem apenas os riscos eminentes da cirurgia.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Anexo E - Parecer consubstanciado da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq- HCFMUSP)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.015.450

O benefício resultante da pesquisa seria a descoberta de novos marcadores para endometriose profunda.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de relevância científica, que busca mais uma possível causa para a etiologia da endometriose. Projeto apresentado de maneira clara, com base em dados clínicos e científicos, com metodologia adequada para a aquisição dos objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores responderam satisfatoriamente aos questionamentos anteriores, e enviaram os TCLEs corrigidos de maneira adequada.

Recomendações:

Recomenda-se que, no item 11 dos TCLEs, seja trocado o termo "pagamento" por "ressarcimento" para que fique mais adequado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não apresenta pendência ética.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Página 02 de 03

Continua

**Conclusão do Anexo E - Parecer consubstanciado da Comissão de Ética para
Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq- HCFMUSP)**

Continuação do Parecer: 1.015.450

SAO PAULO, 08 de Abril de 2015

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo F - Parecer consubstanciado da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq- UFC)

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MARCADORES EM LESÕES DE ENDOMETRIOSE PROFUNDA PELA ABORDAGEM PROTEÔMICA

Pesquisador: Mauricio Simões Abrão

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 07084114.0.3001.5054

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P
CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.257.051

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo caso-controle prospectivo exploratório, com um número pré-determinado de 10 pacientes, sendo 5 pacientes com endometriose profunda de reto-sigmóide (endométrio tópico e ectópico) e 5 pacientes sem endometriose (endométrio tópico). Para o grupo sem endometriose, serão selecionadas mulheres com desejo de esterilização cirúrgica definitiva através de laqueadura tubária por vídeo laparoscopia e previamente aprovadas para o procedimento. As pacientes classificadas para compor o grupo com endometriose serão submetidas a investigação criteriosa através de anamnese, exame físico e exames de imagem. Serão encaminhadas para videolaparoscopia as pacientes que após tratamento clínico não apresentarem resultados satisfatórios e mantiverem queixa de dismenorréia, dispareunia de profundidade, dor pélvica crônica e/ou alterações intestinais cíclicas, associado a ultrassonografia ou ressonância magnética indicando a presença de endometriose profunda de reto-sigmóide. As pacientes serão submetidas à videolaparoscopia para ressecção das lesões endometrióticas, incluindo nódulos de parede intestinal ou ressecção do segmento intestinal acometido pela lesão, seguindo a rotina habitual do serviço. Durante a cirurgia e com o resultado anátomo-patológico, será confirmada a presença da endometriose. Após a cirurgia e remoção dos tecidos de interesse, estes serão recortados em fragmentos menores representativos de cada caso. Nos casos patológicos, coletaremos os

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Anexo F - Parecer consubstanciado da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq- UFC)

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /

Continuação do Parecer: 2.257.051

fragmentos após o material para a análise histopatológica ter sido coletado. Estes fragmentos serão então transportados em recipientes termicamente isolados contendo tampão PBS 0,1 M estéril em condições assépticas, até o Laboratório de Estudos da Biologia do Trofoblasto no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, onde será processado. as amostras serão divididas em cinco partes e os fragmentos serão fixados em formalina 10% em PBS para inclusão em parafina e armazenados em tampão RIPA contendo um coquetel de proteases para análise do conteúdo protéico por meio da eletroforese bidimensional. Os Spots identificados como possíveis candidatos a candidatos a proteínas diferencialmente expressas serão recortados e processados para análise por espectrometria de massas. A análise das amostras será realizada pela técnica de espectrometria de massas, utilizando-se MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption and ionization). Os mapas peptídicos obtidos (peptide fingerprints) serão comparados com bancos de dados de proteínas (EMBL Protein and Peptide Search: MascotSearch; Pepfrag; Protein Prospector). Este trabalho será desenvolvido no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo do estudo visa identificar diferenças na expressão de proteínas do endométrio tópico de pacientes sem endometriose, com endométrio tópico e ectópico de pacientes com endometriose profunda de retossigmoide, utilizando técnicas em proteômica.

Objetivo Secundário:

O objetivo do estudo visa identificar diferenças na expressão de proteínas do endométrio tópico de pacientes sem endometriose, com endométrio tópico e ectópico de pacientes com endometriose profunda de retossigmoide, utilizando técnicas em proteômica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A pesquisa não traz aumento do risco, os riscos são inerentes à cirurgia.

Benefícios:

Descoberta de novos marcadores para endometriose profunda.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O referido estudo visa identificar diferenças na expressão de proteínas do endométrio tópico de pacientes sem endometriose, com endométrio tópico e ectópico de pacientes com endometriose profunda de retossigmoide, utilizando técnicas em proteômica.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Página 02 de 04

Continua

Continuação do Anexo F - Parecer consubstanciado da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq- UFC)

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /

Continuação do Parecer: 2.257.051

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_749748 E1.pdf	04/08/2017 09:58:30		Aceito
Outros	Resposta_ao_Parecer_04_Agosto_2017.pdf	04/08/2017 09:56:02	Mauricio Simões Abrão	Aceito
Outros	Termo_de_ciencia_Biobanco_Hospital_Sirio_Libanes.pdf	04/08/2017 09:53:13	Mauricio Simões Abrão	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_Arlindo_Moura.pdf	04/08/2017 09:51:44	Mauricio Simões Abrão	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_Leonardo_Bezerra.pdf	04/08/2017 09:51:10	Mauricio Simões Abrão	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_749748 E1.pdf	17/08/2016 20:38:25		Aceito
Outros	Formulario_para_submissao_de_emenda_Agosto_2016.pdf	17/08/2016 20:36:26	Mauricio Simões Abrão	Aceito
Outros	Justificativa_Emenda_Agosto_2016.pdf	17/08/2016 20:33:04	Mauricio Simões Abrão	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_atualizado_17_08_16.pdf	17/08/2016 20:32:37	Mauricio Simões Abrão	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controle (30.03.15).pdf	30/03/2015 10:16:49		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_casos (30.03.15).pdf	30/03/2015 10:11:59		Aceito
Outros	Resposta ao Parecer Consubstanciado (30.03.15).pdf	30/03/2015 10:11:14		Aceito
Outros	Resposta ao Parecer	03/03/2015		Aceito

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

CEP: 60.430-275

E-mail: comepe@ufc.br

Conclusão do Anexo F - Parecer consubstanciado da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq- UFC)

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /

Continuação do Parecer: 2.257.051

Outros	Consubstanciado do CEP.pdf	16:33:05		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controle_11_02_2015.pdf	03/03/2015 16:32:20		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_casos_11_02_2015.pdf	03/03/2015 16:31:55		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	18/02/2014 15:16:01		Aceito
Outros	Cadastro on line (Anexo II).pdf	15/01/2014 08:07:16		Aceito
Outros	Aprovação CEPDOG.pdf	15/01/2014 08:06:20		Aceito
Outros	Carta de anuência.pdf	15/01/2014 08:05:51		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE (pacientes sem endometriose)_23_12_13.docx	15/01/2014 08:05:25		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE (pacientes com endometriose)_23_12_13.docx	15/01/2014 08:05:05		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Pesquisa_23_12_13.docx	15/01/2014 08:04:39		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 04 de Setembro de 2017

Assinado por:

FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

CEP: 60.430-275

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continua

Anexo G - Questionário para coleta de dados das pacientes incluídas no estudo

Dados Clínicos da Paciente

Esta ficha se trata de algumas questões sobre aspectos de sua vida, principalmente relacionada à sua saúde. Pedimos, por favor, que tente responder da melhor maneira possível, pois essas informações nos ajudarão a solucionar muitas dúvidas sobre o diagnóstico e o tratamento de doenças, como por exemplo, a Endometriose

Data ____/____/____ Médico: _____ Registro: _____

Em qual dia de seu ciclo menstrual você estará no dia da cirurgia? OU quando foi a sua última menstruação antes da cirurgia? _____

() Não sei.

() Nenhum – Motivo: _____

Dados Pessoais:

Nome: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ (____ anos)

Altura: _____ **Peso:** _____

Raça: () Branca () Negra () Amarela () Parda

Estado Civil: () Solteira () Estável – casada ou amasiada () Viúva () Separada

Grau de Instrução: () Nenhum () Primeiro Grau () Segundo Grau () Superior

Endereço (Rua, Número, Cidade, CEP): _____

Telefone para contato: () ____ - ____ ou () ____ - ____

E-mail: _____

Antecedentes:

1) Você tem, ou teve alguma doença na sua vida? (Independente da doença atual)

() Não () Sim Se sim, qual (quais)? _____

2) Você realiza atividade física regular(*)?

() Não () Sim

(*) Exercícios com duração de 30 minutos, com frequência de no mínimo 3 vezes por semana.

3) Você fuma?

() Não () Não mais. () Sim, _____ cigarros por dia

Continua

Continuação do Anexo G - Questionário para coleta de dados das pacientes incluídas no estudo

4) Você já passou por alguma cirurgia por Endometriose?

() Não () Sim Se sim, quantas? _____

5) Você já passou por alguma outra cirurgia no abdômen?

() Não () Sim Se sim, quantas? _____ // E quais? _____

6) Você toma, ou tomou, nos últimos 3 meses, algum dos medicamentos abaixo?

() Não () Anticoncepcional Oral () Zoladex () Lupron () Mirena
 () Evra () Depoprovera () ~~Farlutal~~ () Dimetrose () Nuvaring
 () Provera () Primolut-nor () Cerazette () Outros: _____

7) Você sabe de algum caso de Endometriose na sua família?

() Não () Sim Se sim, quem? (grau de parentesco) _____

8) Seu ciclo menstrual é regular?

() Não () Sim _____ dias de menstruação // _____ dias de intervalo.

9) Você considera seu fluxo: () Diminuído; () Normal ou () Aumentado?

10) Com quantos anos você menstruou pela primeira vez? _____ anos.

11) Você utiliza, ou utilizou na vida, algum Método Anticoncepcional Prévio?

() Não () Comportamental () ~~Perlutan/Mesygina~~ () Diu (simples) () Evra
 () Camisinha () ~~Depo-provera~~ () Mirena () Pílula () Nuvaring

12) Você já engravidou alguma vez?

() Não () Sim Se sim, quantas delas foram: _____ Partos Normais _____ Partos Cesárea
 _____ Abortos _____ Gravidez Ectópica

Continua

Continuação do Anexo G- Questionário para coleta de dados das pacientes incluídas no estudo

Quadro Clínico:

1) Se você possui sintomas, cite o que você consideraria o principal deles, e por quanto tempo este a perturba: _____ // ____ anos.

2) Baseado na seguinte escala visual analógica de dor:

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sem dor										Pior dor existente

Responda sobre os seguintes sintomas.

A) Você sente cólicas menstruais?

- () Não
- () Sim, e não necessita de medicação. [Escala de dor nº ____]
- () Sim, e necessita de medicação para alivia-las. [Escala de dor nº ____]
- () Sim, e necessita de medicação para alivia-las, no entanto não melhoram. [Escala de dor nº ____]
- () Sim, e necessita de medicação, no entanto elas não melhoram e já precisou ir ao Pronto Socorro ou faltar ao trabalho em decorrência das mesmas. [Escala de dor nº ____]

B) Você sente cólicas que não apresentam relação nenhuma com o seu ciclo menstrual, e que não melhoram mesmo tomando analgésicos?

- () Não
- () Sim, e não necessita de medicação. [Escala de dor nº ____]
- () Sim, e necessita de medicação para alivia-las. [Escala de dor nº ____]
- () Sim, e necessita de medicação para alivia-las, no entanto não melhoram. [Escala de dor nº ____]
- () Sim, e necessita de medicação, no entanto elas não melhoram e já precisou ir ao Pronto Socorro, ou faltar ao trabalho em decorrência das mesmas. [Escala de dor nº ____]

Continua

Conclusão do Anexo G - Questionário para coleta de dados das pacientes incluídas no estudo

C) Você sente dor na relação sexual?

- ☐ Não
- ☐ Na penetração.
- ☐ De profundidade (Dor no fundo da vagina). [Escala de dor nº ____]

D) Você sente alterações intestinais relacionadas com a menstruação?

- ☐ Não ☐ Dor, [Escala de dor nº ____] ☐ Sangramento
- ☐ Intestino Solto ☐ Intestino Preso
- ☐ Outros: _____

E) Você sente alterações urinárias relacionadas com a menstruação?

- ☐ Não ☐ Dor, [Escala de dor nº ____]
- ☐ Sangramento ☐ Aumento da frequência
- ☐ Outros, _____

3) Em relação a sua fertilidade, você:

- ☐ Nunca conseguiu engravidar.
- ☐ Possui filhos, mas atualmente não consegue engravidar.
- ☐ Não tenta engravidar (não tem vida sexual ativa, usa método anticoncepcional, etc.)
- ☐ Já possui filhos, e não deseja mais engravidar.

4) Se não consegue engravidar, isso se deve à:

- ☐ Motivo desconhecido ☐ Fator Masculino ☐ Tubário
- ☐ Insuficiência Ovariana ☐ Outros Ovulatórios ☐ Outros: _____

5) Você já fez algum tratamento para engravidar?

- ☐ Não ☐ Indução Ovulatória
- ☐ Inseminação Intra-uterina ☐ Fertilização In Vitro

Anexo H

Tabela –S1 Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (todos os grupos)

Identificação Progenesis	Código UniProt	Anova (p-valor)	Fold-change de expressão
P0DME0	SETSIP	0,04	3,47
Q9UQ35	SRRM2	0,02	3,32
Q13938	CAPS	0,0000295	3,04
C9J386	H2AFV	0,03	3
Q15424	SAFB	0,01	2,99
Q14247	CTTN	0,03	2,5
Q96FJ2	DYNLL2	0,05	2,18
Q7Z2K5	HBB	0,03	2,05
O43633	CHMP2A	0,04	2,01
P38159	RBMX	0,02	1,94
A0A0D9SEM4	SRSF4	0,00859	1,87
Q53SS8	PCBP1	0,02	1,85
P11142	HSPA8	0,04	1,82
P38398	BRCA1	0,05	1,8
A0A024R9D7	DECR1	0,05	1,8
B7Z570	SRSF1	0,02	1,78
O43491	EPB41L2	0,02	1,77
P09496-2	CLTA	0,00545	1,76
Q14151	SAFB2	0,02	1,72
F8W1K5	CNPY2	0,05	1,7
P69892	HBG2	0,04	1,7
F8VRV5	DYNLL1	0,00538	1,68
D6RFM3	HNRNPH1	0,03	1,64
E9PP76	CCS	0,05	1,62
C9JL85	MTPN	0,04	1,61
Q14980-2	NUMA1	0,00637	1,6
B4DEA3	RAD23B	0,00123	1,59
P11021	HSPA5	0,05	1,51
Q01105-3	SET	0,04	1,51
Q01082	SPTBN1	0,00869	-1,51
C9JV77	AHSG	0,02	-1,59
Q8NHQ9	DDX55	0,02	-1,59
B7Z4L7	RBM39	0,03	-1,59
P02768	ALB	0,05	-1,6
P21291	CSRP1	0,04	-1,6
Q92599-3		0,01	-1,6

Continua

Conclusão da Tabela –S1 Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (todos os grupos)

Identificação Progenesis	Código UniProt	Anova (p-valor)	Fold-change de expressão
Q58FF7	HSP90AB3P	0,04	-1,61
B4E1B2	TF	0,02	-1,62
B3KMK3	NUP155	0,03	-1,63
Q7Z406-2	MYH14	0,00181	-1,64
P01024	C3	0,00766	-1,65
Q9UL89	IGHV1-69	0,02	-1,68
B4DRR0	KRT6A	0,03	-1,73
Q1L857	CP	0,03	-1,75
P00918	CA2	0,02	-1,77
P10323	ACR	0,03	-1,78
B1AHL2	FBLN1	0,04	-1,95
P01625	IGKV4-1	0,05	-2,05
G3V113	UBE2V2	0,0093	-2,12
Q5T985	ITIH2	0,01	-2,31
Q96P66	GPR101	0,05	-2,54
Q9NPP6	IGH	0,000799	-2,9
O14645	DNALI1	0,01	-3,36
Q14508-2	WFDC2	0,02	-3,51
Q16352	INA	0,04	-3,52
B4E3V1	DDAH1	0,00768	-3,75
Q6N094	IGHG1	0,00694	-3,76
Q8WXA3-2	RUFY2	0,05	-3,82
B4DW90	SF3A3	0,05	-3,95
P02788-2	LTF	0,03	-5,32
P16188	HLA-A	0,02	-5,9
P01591	JCHAIN	0,02	-9,53
P01833	PIGR	0,01	-14,03
P03973	SLPI	0,02	-16,83
Q8NB25	FAM184A	0,04	-29,97
Q8TDL5	BPIFB1	0,01	-39,16

FONTE: *Software Progenesis Q1 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK)*.
 Teste estatístico: análise de variância anova ($p < 0,05$).

Anexo I

Tabela S2 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estádio II, fase menstrual proliferativa)

Identificação Progenesis	Código UniProt	Anova (p-valor)	Fold-change de expressão
B4DRE8	EEF2	0,01	140,32
P25815	S100P	0,04	33,12
E9PK47	PYGL	0,04	7,41
V9HWB4	HSPA5	0,04	6,62
Q9Y2T3	GDA	0,000874	6,36
F8VP67	KRT8	0,05	5,8
Q9UBQ0	VPS29	0,04	3,87
E9KL44	HADHA	0,03	3,44
A0A140VK27	LTA4H	0,02	3,4
B9EGR5	MGA	0,03	3,4
P08727	KRT19	0,00613	3,39
H3BQF1	APRT	0,03	3,37
B4DVU9	HSPA1A/HSPA1B	0,02	3,3
Q9BV28	TUBB3	0,00918	3,28
B3KXN4	WDR1	0,02	3,25
A8K2H4	CTSB	0,03	3,18
B4DPZ4	ARHGAP1	0,00253	3,15
U3KQK0	HIST1H2BN	0,05	3,12
F5GXY2	LDHA	0,02	3,08
P28838	LAP3	0,03	3,01
P46940	IQGAP1	0,04	3
R4GN08	ARPC4	0,05	2,98
A0A286SD59	DDX39B	0,05	2,98
A0A087WYR3	TPD52L2	0,05	2,95
Q5S4N1	DDX3X	0,02	2,9
F8VRP1	CS	0,03	2,86
B7Z268	SSBP1	0,04	2,82
K7EQ86	KIAA0100	0,04	2,67
B4DJQ8	CTSC	0,02	2,61
Q08211	DHX9	0,03	2,55
Q53HU8	VIM	0,01	2,53
A6NH27	ZWINT	0,04	2,52
H7BXZ5	KALRN	0,03	2,5
V9HW31	ATP5F1B	0,02	2,48
F8W180	MYL6	0,04	2,41
F6UXX1	SYNCRIP	0,02	2,41
Q53G76	ACTB	0,00892	2,36
Q15181	PPA1	0,03	2,33
V9HVZ4	GAPDH	0,02	2,32
A0A0U1RRM4	PTBP1	0,04	2,32
B2R7W4	HNRNPR	0,04	2,29
P37802	TAGLN2	0,03	2,29

Continua

Continuação da Tabela S2 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estádio II, fase menstrual proliferativa)

Identificação Progenesis	Código UniProt	Anova (p-valor)	Fold-change de expressão
A0A024R4F1	ENO1	0,01	2,28
Q59GX5	LCP1	0,02	2,25
Q969H8	MYDGF	0,04	2,25
Q5T0R1	CAP1	0,00342	2,2
Q9H799	CPLANE1	0,01	2,2
Q9NUV1	CNDP2	0,03	2,17
F5H823	RAP1B	0,02	2,17
F5H5D3	TUBA1C	0,04	2,16
P09651	HNRNPA1	0,01	2,12
Q96GW1	HSP90B1	0,05	2,08
V9HWK2	VCL	0,00557	2,08
A0A024R5K1	CORO1B	0,04	2,07
E7EMB3	CALM1	0,05	2,06
A8MW50	LDHB	0,03	2,05
Q15019	SEPT2	0,05	2,04
A2A274	ACO2	0,00322	2,02
Q9HAP1	VCP	0,05	2
A8K0G3	AP2B1	0,03	1,99
P09211	GSTP1	0,05	1,99
P30044	PRDX5	0,02	1,99
P52209	PGD	0,02	1,97
P60174	TPI1	0,03	1,95
A0A1B0GVG2	ASAH1	0,05	1,88
B4DLV7	GDI2	0,02	1,86
V9HW62	GLO1	0,02	1,83
K7EM20	YWHAE	0,00982	1,83
B4DY04	YWHAQ	0,01	1,8
O75396	SEC22B	0,05	1,78
A0A0B4J1R6	TKT	0,05	1,78
Q53FF5	NSFL1C	0,04	1,67
Q9H4N8	YWHAH	0,02	1,55
P02753	RBP4	0,00724	-1,7
P25311	AZGP1	0,05	-1,87
A5PL27	CP	0,03	-2,04
A0A0K0Q2Z1	SERPINC1	0,02	-2,04
P02790	HPX	0,02	-2,19
P01861	IGHG4	0,03	-2,19
P15531	NME1	0,04	-2,26
V9HWA9	C3	0,00874	-2,28
Q2F831	YWHAZ	0,00678	-2,35
Q96CD0	FBXL8	0,02	-2,43
V9HWF6	ORM1	0,00803	-2,55
B1AHL2	FBLN1	0,04	-2,59
A0A286YFY4	IGHG2	0,02	-2,62
E9PGN7	SERPING1	0,04	-2,62
Q68DS3	CLEC3B	0,03	-2,66

Continua

Conclusão da Tabela S2 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estádio II, fase menstrual proliferativa)

Identificação Progenesis	Código UniProt	Anova (p-valor)	<i>Fold-change</i> de expressão
B3KS79	SERPINA3	0,02	-5,04
A0A024R6I7	SERPINA1	0,02	-7,76
J3QSB4	RPL13	0,03	-8,78
F8VVI6	CPM	0,0064	-15,09
Q8IX02	LTF	0,04	-32,87
Q9Y6R7	FCGBP	0,00999	-42,71
A7Y9J9	MUC5AC	0,03	-72,44

FONTE: *Software Progenesis Q1 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK)*.

Teste estatístico: análise de variância anova ($p < 0,05$).

Anexo J

Tabela S3 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estágio IV, fase menstrual proliferativa)

Identificação Progenesis	Código UniProt	Anova (p-valor)	Fold-change de expressão
Q9H444	CHMP4B	0,000176	145,2
L7RDA5	DES	0,00153	72,02
B4DRS1	MATR3	0,000373	59,05
B4DVS4	ECH1	0,000171	58,52
Q9P1D9	EIF3I	0,0000145	53,28
P55290	CDH13	0,00191	49,03
P48059	LIMS1	0,0000897	48,29
L0R5C4	POTEG	0,00648	42,36
F8WD80	UBE2F	0,00000438	38,07
P14209	CD99	0,00559	30,24
D3DTX7	COL1A1	0,000405	25,14
P15531	NME1	0,00352	21,36
P0C0S5	H2AFZ	0,00214	18,69
O75367	H2AFY	0,00674	17,2
Q16778	HIST2H2BE	0,00149	15,68
B3KRY3	LAMP1	0,00145	14,01
Q5TEC6	HIST2H3PS2	0,00401	13,74
P62913	RPL11	0,000348	12,62
C9J0K6	SRI	0,0034	11,31
D6R9A6	HMGB2	0,01	11,16
A8MTJ3	GNAT3	0,02	10,72
H0YIB4	SRSF9	0,00453	10,67
B5MBZ8	PPP1R7	0,02	10,34
P16401	HIST1H1B	0,01	9,8
H3BRG4	UQCRC2	0,00612	9,54
H7C040	AGR3	0,02	9,53
P43686	PSMC4	0,00989	8,5
Q9BT78	COPS4	0,03	8,11
C9JQ41	CCDC58	0,00473	7,95
Q16777	HIST2H2AC	0,000158	7,74
Q6FGH9	DYNLL1	0,02	7,25
O75369	FLNB	0,02	7,2
A0A140T936	VAR5	0,02	6,99
P10412	HIST1H1E	0,03	6,75
P31930	UQCRC1	0,01	6,54
A0A024RDQ0	HSPH1	0,04	6,45
Q6IBG1	MYL9	0,04	6,45
B4E312	TAF15	0,04	6,44
Q5SQT3	H2AFY2	0,04	6,4
A0A087X2D0	SRSF3	0,03	6,4
Q15233	NONO	0,01	6,23
S5DU27	HLA-C	0,03	5,88
A8KAQ5	SNRNP70	0,00943	5,82
P07360	C8G	0,05	5,71

Continua

Continuação da Tabela S3 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estágio IV, fase menstrual proliferativa)

Identificação Progenesis	Código UniProt	Anova (p-valor)	Fold-change de expressão
B4DDR3	API5	0,02	5,68
Q96FJ2	DYNLL2	0,03	5,67
Q7Z4Y4	AK3	0,04	5,64
P38117	ETFB	0,00372	5,56
F8WES2	MTAP	0,00114	5,45
A2A3R6	RPS6	0,03	5,41
H7BZ35	DARS	0,03	5,4
C9JSU1	LRRFIP2	0,04	5,34
A0A024RAE4	CDC42	0,00416	5,26
H3BLU7	AKR7A2	0,03	5,24
Q9UBT2	UBA2	0,01	5,2
P62316	SNRPD2	0,00103	5,11
C9JXB8	RPL24	0,02	5,08
B3KSG0	ISYNA1	0,00622	5,06
A0A140TA33	TNXB	0,02	5,06
B4DZP5	DDB1	0,05	5,01
Q59H57	FUS	0,05	4,95
Q5T7C4	HMGB1	0,04	4,87
Q8WX93	PALLD	0,02	4,85
P55795	HNRNPH2	0,02	4,62
O00264	PGRMC1	0,01	4,61
O14561	NDUFAB1	0,03	4,59
P17987	TCP1	0,03	4,56
C9J712	PFN2	0,04	4,47
B7Z4B7	FHL1	0,006	4,44
Q59FA2	SRSF1	0,00289	4,44
Q9Y265	RUVBL1	0,00323	4,43
A0A0S2Z377	ANXA6	0,02	4,4
J3QL05	SRSF2	0,04	4,38
H0YJB9	RTRAF	0,03	4,36
Q6FHM6	SNU13	0,02	4,35
Q9BSV4	SFPQ	0,00682	4,34
F2Z388	RPL35	0,04	4,3
A6NLN1	PTBP1	0,02	4,28
E9KL35	RACK1	0,01	4,28
K7EL21	CAPS	0,03	4,27
Q6LEE2	PCBD1	0,03	4,24
Q9Y3U8	RPL36	0,04	4,24
P23396	RPS3	0,02	4,23
D6RGI3	SEPT11	0,00855	4,23
H7C233	SUCLG1	0,05	4,14
A0A0S2Z3W7	ITPA	0,02	4,02
E9PCY7	HNRNPH1	0,02	3,99
B4DNM8	P3H1	0,000502	3,99
Q9BTQ7	RPL23	0,03	3,93

Continua

Continuação da Tabela S3 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estágio IV, fase menstrual proliferativa)

Identificação Progenesis	Código UniProt	Anova (p-valor)	Fold-change de expressão
D6W539	HADHB	0,02	3,88
Q59EY4	SEPT7	0,00406	3,86
A0A024QZV0	TXNDC5	0,00436	3,84
P31948	STIP1	0,03	3,8
P49411	TUFM	0,05	3,79
Q53GL5	IDH2	0,03	3,78
J3QLI9	SNRPD1	0,03	3,78
P61160	ACTR2	0,04	3,76
F6RFD5	DSTN	0,02	3,75
Q0VGD6	HNRNPR	0,00591	3,73
F5GYN4	OTUB1	0,03	3,73
V9HW31	ATP5F1B	0,01	3,7
B2R959	HNRNPL	0,02	3,7
Q14568	HSP90AA2P	0,00829	3,7
Q9Y266	NUDC	0,02	3,7
P62241	RPS8	0,04	3,7
Q53XJ5	FKBP2	0,05	3,69
A0A087WUK2	HNRNPDL	0,02	3,69
K7EMD6	SGTA	0,04	3,65
P62318	SNRPD3	0,02	3,65
E5RIW3	TBCA	0,02	3,65
Q8TB01	CKAP4	0,00391	3,63
P35268	RPL22	0,02	3,62
P68363	TUBA1B	0,01	3,61
P20674	COX5A	0,02	3,6
P31939	ATIC	0,03	3,59
A0A024RCM3	DDX39B	0,02	3,58
G8JLA2	MYL6	0,01	3,58
B7ZAR1	CCT5	0,01	3,57
P37108	SRP14	0,05	3,57
Q96CN7	ISOC1	0,03	3,56
V9HVX6	ALDH1A1	0,04	3,55
Q03252	LMNB2	0,01	3,55
B4DZ08	ACO2	0,05	3,54
P29373	CRABP2	0,03	3,5
P30049	ATP5F1D	0,02	3,49
K7EKP1	APOC1	0,05	3,48
B4DY09	ILF2	0,05	3,48
V9HW53	DDAH2	0,05	3,47
O94788	ALDH1A2	0,00383	3,42
Q92688	ANP32B	0,04	3,41
A0A024R8Q1	GAA	0,02	3,41
A0A024R4K3	MDH2	0,03	3,41
B3KSQ7	DBN1	0,04	3,39
B2R5U1	SND1	0,02	3,39
D6R9P3	HNRNPAB	0,04	3,36

Continua

Continuação da Tabela S3 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estágio IV, fase menstrual proliferativa)

Identificação Progenesis	Identificação Progenesis	Identificação Progenesis	Identificação Progenesis
Q5CAQ5	HSP90B1	0,04	3,36
P39019	RPS19	0,05	3,34
P50454	SERPINH1	0,00691	3,32
A0A0U4BW16	MYH9	0,02	3,31
P24666	ACP1	0,00142	3,29
B4DUQ1	HNRNPK	0,03	3,29
H3BPC4	UBE2I	0,0078	3,28
B5MCX3	SEPT2	0,00878	3,26
Q71U36	TUBA1A	0,02	3,25
A0A087X0X3	HNRNPM	0,04	3,24
E9PJD9	RPL27A	0,03	3,23
Q08211	DHX9	0,00322	3,22
Q60FE6	FLNA	0,04	3,22
B2R5W2	HNRNPC	0,04	3,22
Q7Z612	RPLP1	0,04	3,2
Q59GL1	SYNCRIP	0,01	3,19
Q9Y3Z3	SAMHD1	0,02	3,18
Q13263	TRIM28	0,05	3,18
Q562R1	ACTBL2	0,03	3,17
E7EX53	RPL15	0,0079	3,17
P62873	GNB1	0,03	3,14
P52209	PGD	0,00144	3,14
Q16762	TST	0,03	3,12
Q53GC7	CAPZA2	0,00273	3,1
F8W1A4	AK2	0,04	3,09
P07437	TUBB	0,02	3,09
V9HWP5	PPA1	0,04	3,08
D6RAW0	UBE2D3	0,00121	3,07
A8K6Y1	PA2G4	0,04	3,06
B8ZZU8	ELOB	0,04	3,05
Q14240	EIF4A2	0,03	3,04
P02461	COL3A1	0,04	3,03
P49458	SRP9	0,04	3,03
P05455	SSB	0,01	3,03
Q96IR1	RPS4X	0,00447	3,01
B4DXX4	GDI1	0,04	3
B7Z972	PCMT1	0,00365	2,99
P63261	ACTG1	0,02	2,97
P07195	LDHB	0,03	2,97
Q9NTK5	OLA1	0,01	2,96
O43396	TXNL1	0,05	2,96
B3KQ51	PPP2CA	0,04	2,94
A0A024RAI1	ACTR3	0,01	2,93
A0A087WTP3	KHSRP	0,03	2,92
B4DPW9	PLS3	0,02	2,92
O60701	UGDH	0,04	2,91

Continua

Continuação da Tabela S3 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estágio IV, fase menstrual proliferativa)

Identificação Progenesis	Identificação Progenesis	Identificação Progenesis	Identificação Progenesis
P50395	GDI2	0,00142	2,9
B4E1T4	SFRP4	0,04	2,9
P31942	HNRNPH3	0,02	2,86
A0A0S2Z4G7	NPM1	0,02	2,85
H0YNW5	DUT	0,03	2,84
P28838	LAP3	0,03	2,83
B4DVZ8	LTA4H	0,01	2,82
P50914	RPL14	0,05	2,81
B4DU58	CAPG	0,03	2,79
B4DL49	CTSB	0,03	2,77
P14618	PKM	0,01	2,77
Q9Y490	TLN1	0,02	2,77
B4DDB6	HNRNPA3	0,04	2,76
V9HW41	UBE2N	0,05	2,76
B4DH02	HSPA4	0,05	2,75
Q6IPN6	EEF1A1	0,04	2,74
V9HVZ4	GAPDH	0,03	2,73
P07900	HSP90AA1	0,03	2,73
V9HWE9	GSTP1	0,03	2,72
H3BQZ7	HNRNPUL2-BSCL2	0,02	2,72
P61970	NUTF2	0,02	2,72
A0A024RDF4	HNRNPD	0,02	2,71
B1Q3B3	FTL	0,04	2,69
F8VZ49	HNRNPA1	0,02	2,67
A0A024R4F1	ENO1	0,02	2,66
A4D177	CBX3	0,03	2,65
Q9Y3I0	RTCB	0,04	2,65
B3KTA3	FSCN1	0,03	2,64
B4DKN9	RHOA	0,0079	2,6
P22314	UBA1	0,03	2,6
P27824	CANX	0,04	2,59
Q9UPN1	PPP1CC	0,05	2,59
H0YN26	ANP32A	0,02	2,58
A0A024R3X4	HSPD1	0,02	2,58
F6WIT2	PTPA	0,00964	2,58
B4DX14	ALDH9A1	0,03	2,56
P13639	EEF2	0,04	2,54
P78417	GSTO1	0,03	2,53
Q9H2U2	PPA2	0,02	2,53
A8K7F6	EIF4A1	0,05	2,51
K7EK07	H3F3A/H3F3B	0,00872	2,5
B4DDZ5	HADHA	0,01	2,47
V9HWB9	LDHA	0,05	2,46
X6RJP6	TAGLN2	0,02	2,45
P68402	PAFAH1B2	0,01	2,39
A0A024QYX3	RBM3	0,02	2,38

Continua

Conclusão da Tabela S3 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estágio IV, fase menstrual proliferativa)

Identificação Progenesis	Identificação Progenesis	Identificação Progenesis	Identificação Progenesis
B4DNR3	ABHD14B	0,02	2,37
V9HW80	VCP	0,04	2,36
F8W020	NAP1L1	0,04	2,35
D3DQ69	SERBP1	0,05	2,35
A0A1B0GW44	CTSD	0,05	2,34
O95994	AGR2	0,01	2,33
A8K590	ILF3	0,03	2,33
P63208	SKP1	0,03	2,33
P27348	YWHAQ	0,02	2,33
Q2Q9B7	G6PD	0,03	2,32
A0A024R694	ACTN1	0,03	2,31
B7Z3S4	HDAC1	0,02	2,3
A0A024R1U4	RAB5C	0,04	2,28
Q04760	GLO1	0,02	2,27
P62258	YWHAE	0,03	2,2
P63241	EIF5A	0,04	2,16
P13010	XRCC5	0,03	2,14
A4QPB0	IQGAP1	0,03	2,13
Q86V81	ALYREF	0,04	2,11
A0A024R442	DNPEP	0,05	2,1
Q04917	YWHAH	0,03	2,08
E7END7	RAB1A	0,03	2,05
Q6ZN40	TPM1	0,03	2
P61981	YWHAG	0,000772	1,83
V9HWA9	C3	0,03	-1,43
P06727	APOA4	0,02	-2,68
B4DPP6	ALB	0,00686	-6,18
H0Y6A4	PAEP	0,05	-18,22

FONTE: *Software Progenesis Q1 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK).*

Teste estatístico: análise de variância anova ($p < 0,05$).

Anexo K

Tabela S4 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estádio II, fase menstrual secretora)

Identificação Progenesis	Código UniProt	Anova (p-valor)	Fold-change de expressão
A0A087WWY3	FLNA	0,05	207,18
B4DUP0	EEF1G	0,04	129,03
A0A024RCA7	RPLP2	0,00109	125,76
P67809	YBX1	0,00322	68,47
Q7Z532	OGN	0,03	43,16
F2Z2S8	RPS3	0,03	38,27
Q6IA16	NUCKS1	0,03	34,28
P08727	KRT19	0,04	33,6
D6R9A6	HMGB2	0,01	33,24
A0A024RDG1	USO1	0,00676	32,27
H0Y704	ZNF185	0,01	27,89
A0A024QZV0	TXNDC5	0,02	24,95
C9JMJ2	SFRP4	0,02	23,54
P49411	TUFM	0,02	18,89
H0YEG8	NUCB2	0,01	17,13
S4R457	HNRNPK	0,000427	16,55
H0YAG8	ADH5	0,04	16
Q53GL6	RALY	0,02	15,56
B4DLL8	GPNMB	0,02	14,82
A0A0C4DGM1	TPSAB1/TPSB2	0,03	13,7
D6R991	MATR3	0,01	13,49
Q59G24	SUB1	0,02	12,58
B2R4M6	S100A9	0,02	12,27
Q16643	DBN1	0,02	11,75
Q8NDV3	SMC1B	0,04	11,4
Q6NZI2	CAVIN1	0,02	11,36
B4DLP5	TXNDC11	0,04	11,09
B7Z6S8	RPL14	0,02	11,03
Q9Y6R7	FCGBP	0,01	10,52
A0A090N8Y2	PDIA4	0,01	10,29
J3QR68	HP	0,03	9,62
B4DHY1	HNRNPH3	0,03	9,5
Q53EU7	NDRG1	0,02	9,41
B2RTX2	PALLD	0,04	9,25
Q5D6A5	GSTP1	0,03	8,89
P08670	VIM	0,01	8,48
B2R9V7	SOD3	0,03	8,45
B7Z4W4	RAD23B	0,01	8,36
E5RIP1	RPS20	0,0096	8,31
V9HWP0	APCS	0,0098	8,07
J3QLE5	SNRPN	0,02	8,07
P02792	FTL	0,01	8,03
G8JLJ2	SOD2	0,03	8,03
P28072	PSMB6	0,02	7,94

Continua

Continuação da Tabela S4 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estádio II, fase menstrual secretora)

Identificação Progenesis	Identificação Progenesis	Identificação Progenesis	Identificação Progenesis
A0A087WTP3	KHSRP	0,00711	7,21
Q6NZ44	FTH1	0,000614	7,1
G3V5M2	PNP	0,01	7,1
Q5TA02	GSTO1	0,0043	6,77
Q59FU3	FUBP1	0,03	6,57
E9PPU6	NAGK	0,05	6,41
Q8NAG3	TPM3	0,04	6,38
A0A024R5H0	BANF1	0,03	6,2
A0A024QZJ6	MYH11	0,02	6,2
A7BI36	RRBP1	0,05	6,2
F8VRK0	TUBA1B	0,00612	6,1
E9PB61	ALYREF	0,00617	6,04
H0YDS0	UBQLN1	0,04	6,02
D3DWL0	PLEC	0,04	5,98
P54687	BCAT1	0,00812	5,95
A0A1B0GV06	ASAH1	0,05	5,88
B2R4F3	ARHGDIB	0,04	5,84
B4DLX5	PTPA	0,00342	5,83
B3KY04	KCTD12	0,05	5,76
B4E3Q9	VCL	0,03	5,32
Q96HX0	TUBB4B	0,02	5,3
P67936	TPM4	0,03	5,13
Q0P5N8	TMSB10/TMSB4X	0,03	5,12
Q69YR8	GSN	0,04	5,1
P05787	KRT8	0,02	5,06
K7ELL7	PRKCSH	0,02	5,06
O14950	MYL12B	0,02	5,04
G8JLB6	HNRNPH1	0,04	4,94
Q53FV4	LUM	0,00645	4,73
A0A0J9YXB8	PSAP	0,04	4,62
Q06830	PRDX1	0,00902	4,59
I6L965	KRT18	0,04	4,56
C9JYS8	NONO	0,03	4,53
P08236	GUSB	0,03	4,49
P00747	PLG	0,03	4,45
P63261	ACTG1	0,00656	4,43
A0A024R1A3	UBA1	0,01	4,35
H0YKP3	TPM1	0,05	4,28
O00193	C11orf58	0,04	4,18
Q59FA2	SRSF1	0,01	4,17
B4E1B2	TF	0,21	4,17
O43707	ACTN4	0,03	4,12
F8VPP1	AK2	0,04	4,11
B4DHX4	GDI1	0,05	4,11
P23246	SFPQ	0,07	4,09
A0A0C4DGQ5	CAPNS1	0,04	3,98
P13010	XRCC5	0,01	3,98

Continua

Continuação da Tabela S4 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estádio II, fase menstrual secretora)

Identificação Progenesis	Identificação Progenesis	Identificação Progenesis	Identificação Progenesis
B4DHR1	CALR	0,04	3,9
K7EMN2	PGD	0,04	3,89
Q5T7C4	HMGB1	0,03	3,84
P60174	TPI1	0,03	3,82
V9HW44	PAFAH1B2	0,01	3,75
B3KQK3	CALU	0,05	3,69
A0A087WXP0	AZU1	0,03	3,67
V9GYG2	AKR1A1	0,05	3,66
P55072	VCP	0,01	3,65
Q6IBN6	CBX1	0,02	3,61
P29966	MARCKS	0,05	3,6
Q09666	AHNAK	0,13	3,57
A8K2H4	CTSB	0,03	3,57
F2Z393	TALDO1	0,04	3,54
Q56G89	ALB	0,01	3,52
Q6EEV6	SUMO4	0,02	3,48
D6RC06	HINT1	0,05	3,41
O95678	KRT75	0,03	3,35
B4E022	TKT	0,03	3,35
A0A024R5Z9	PKM	0,05	3,21
G3V361	CALM1 (includes others)	0,04	3,16
H6VRG1	KRT1	0,02	3,12
A8K6U7	HNRNPUL1	0,04	3,01
E7EX29	YWHAZ	0,05	2,97
P10599	TXN	0,03	2,93
Q9UNU2	C4A/C4B	0,03	2,92
A0A140VK69	GOT1	0,05	2,91
P50395	GDI2	0,04	2,87
Q4JM47	AGR2	0,04	2,86
P62318	SNRPD3	0,03	2,78
A0A0U4BW16	MYH9	0,02	2,75
A0A087WT59	TTR	0,01	2,69
G3V5Z7	PSMA6	0,00882	2,3
P01871	IGHM	0,03	2,25
H0YM50	ANXA2	0,06	2,24
Q09028	RBBP4	0,02	2,24
B2RE56	PPIA	0,02	2,04
P00367	GLUD1	0,18	2
Q68CN4	IGHG1	0,13	1,61
Q8IZI0	HBB	0,84	1,19
A0A1S5UZ07	TLN1	0,69	1,02
A0A087WTT1	PABPC1	0,29	-1,53
A0N071	HBD	0,05	-1,84
A0A024R8S5	P4HB	0,55	-1,93
P27105	STOM	0,03	-2,33
V9HW26	ATP5F1A	0,02	-2,46
B4E216	C3	0,00639	-2,56

Continua

Conclusão da Tabela S4 - Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estádio II, fase menstrual secretora)

Identificação Progenesis	Identificação Progenesis	Identificação Progenesis	Identificação Progenesis
O14979	HNRNPDL	0,38	-3,13
V9HVZ4	GAPDH	0,04	-3,5
P04040	CAT	0,05	-3,94
P02647	APOA1	0,09	-3,97
P35754	GLRX	0,00245	-4,94
P02790	HPX	0,01	-7,52
V9HWE3	CA1	0,04	-8,35
P02671	FGA	0,006	-8,87
Q9Y3Z3	SAMHD1	0,2	-8,94
V9HWJ7	LCP1	0,01	-9,47
A0A024RA52	PSMA2	0,04	-18,88
V9GYM3	APOA2	0,00567	-34,97

FONTE: *Software Progenesis Q1 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK)*.

Teste estatístico: análise de variância anova ($p < 0,05$).

Anexo L

Tabela S5 – Lista de proteínas diferencialmente expressas no endométrio de mulheres com endometriose (estádio IV, fase menstrual secretora)

Identificação Progenesis	Código UniProt	Anova (p-valor)	Fold-change de expressão
B0AZU6	HSPA4	0,00727	81,61
A8K3W9	HSP90AB1	0,01	61,35
H0YLA2	SRP14	0,03	51,07
Q1KSF8	TUBB	0,04	40,41
Q71VF9	SPTB	0,02	35,02
F8W180	MYL6	0,04	34,74
V9HVZ4	GAPDH	0,01	33,36
P06748	NPM1	0,02	28,73
H6VRG1	KRT1	0,03	25,23
P35527	KRT9	0,01	10,27
E9PF18	HADH	0,01	9,87
A0A024R3X4	HSPD1	0,04	9,32
Q9H7K8	CNDP2	0,03	7,72
E2DRY6	ENO1	0,03	6,8
Q15084	PDIA6	0,15	4,06
Q53T09	XRCC5	0,21	2,05
A0A0K2BMD8	HBA1/HBA2	0,44	1,97
P02768	ALB	0,15	1,71
Q53GK6	ACTB	0,3	1,61
B4DEF7	HSPA5	0,42	1,42
Q14473	HBB	0,06	-2,19
B7Z8B6	ITIH1	0,04	-2,43
V9HW31	ATP5F1B	0,05	-2,66
Q68CN4	IGHG1	0,04	-4,12
P02787	TF	0,02	-4,27
A0A0G2JMB2	IGHA2	0,03	-4,72
Q59GR5	BPGM	0,02	-6,54
A5PL27	CP	0,05	-15,38
P01833	PIGR	0,01	-36,59
X6R9L0	DNAJC3	0,02	-87,71
P55072	VCP	0,02	-99,18
V9HWA9	C3	0,000697	-131,39

FONTE: *Software Progenesis QI (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK).*

Teste estatístico: análise de variância anova ($p < 0,05$).

Anexo M

Tabela S6 - Redes de interação mais significativas das proteínas diferencialmente expressas em pacientes com endometriose.

Grupo de pacientes com endometriose	Proteínas da rede de interação	Total de proteínas da rede	Proteínas da amostra	Doenças e vias funcionais
Todos	AGT, AHSG , ALB ,APOH,BIRC5,CCND1,CLU, CP ,CYBA, DDAH1 ,ELANE,F3, FBLN1 ,HNF1A,HSF1, HSPA8 ,IGF2R,IGFBP2,IL7R,ITGAM,ITGB2,JAK1,LMNA, LTF , MYH14 , NUMA1 ,OSCAR, PCBP1 , SLPI , SRSF1 ,TGFB1,TLR3,TNF,VEGFA,miR-146a-5p	20	12	Sinalização e interação célula-a-célula, desenvolvimento e função do sistema hematológico, tráfico de células imunes
	BRCA1 ,CCL5, C CS ,CTDP1,CXCL1,CXCL8,CYP1A1,E2F3,EIF4G1,ELANE, HBB ,HIF1A, HLA-A ,HMGA2, HNRNPH1 , HSPA5 ,IFNG,IGFBP3,Imunoglobulina,JAK1,KIR, KRT6A , MTPN ,NANOG,OSCAR, PIGR ,PTGER2,PTGER4,RAD51,RBBP8,RNA polimerase II, SET ,TLR3,TP63, WFDC2	17	11	Resposta Inflamatória, Lesão do Organismo e Anormalidades, Câncer

Continua

Continuação da Tabela S6 - Redes de interação mais significativas das proteínas diferencialmente expressas em pacientes com endometriose

Grupo de pacientes com endometriose	Proteínas da rede de interação	Total de proteínas da rede	Proteínas da amostra	Doenças e vias funcionais
Endometriose, estágio II, fase proliferativa	ASAH1,ATP5F1B,Akt,C3,CD28,CD3,CS,CTSB,CTSC,Creb,ELANE,ENO1,ERK1/2,HSP90B1,HS PA5,IQGAP1,IgG,KLK6,LCP1,L DHB,LDL,MAP3K7,MUC5AC,M YD88,NME1,NRG1,RAP1B,RBP 4,SERPINA1,SE RPINA3,TCR,T PI1,VCP,VIM,Y WHAZ	36	22	Movimento Celular, Câncer, Doença Gastrointestinal
	CALM1,CCL2,C CL5,CCND1,CD KN1A,CELF1,C OL18A1,CXCL1 2,ELAVL1,ERK1 /2,ETV5,FH,GLI 1,GSTP1,HADH A,HNRNPA1,H NRNPR,IL15,IL1 B,Jnk,KRT18,K RT19,KRT8,LD HA,MGA,NFE2L 2,NOS3,PGD,PI K3CA,PTBP1,R PL13,TGFBR2, TKT,TLR4,TNF SF10	17	13	Desenvolvimento Celular, Crescimento Celular e Proliferação, Desenvolvimento de Órgãos

Continuação da Tabela S6 - Redes de interação mais significativas das proteínas diferencialmente expressas em pacientes com endometriose.

Grupo de pacientes com endometriose	Grupo de pacientes com endometriose	Grupo de pacientes com endometriose	Grupo de pacientes com endometriose	Grupo de pacientes com endometriose
Endometriose, estágio IV, fase proliferativa	26s Proteasome, AC TR2, ACTR3, Akt , C3, COL3A1, CT SB, CTSD, Creb, DES, DNA- PK, ERK1/2, FSC N1, HMGB1, HS P90AA1, HSP90 B1, HSPD1, Hsp 90, IQGAP1, LA MP1, LDL, LIMS 1, NFkB (complexo), NME 1, NPM1, PI3K (complexo), PPP 2CA, RHOA, RP L15, RPS6, STIP 1, TCR, VCP, Veg f, XRCC5	31	24	Comprometimento Celular, Resposta Inflamatória, Câncer
	AK2, APOA4, Akt , CBL, CCL22, CC L3, CCND2, CD3, CDC42, CXCL11 , CXCR4, ECH1, EEF2, GRM1, HN RNPK, IDH2, LD HB, MAPK14, M DH2, MYC, NFKB 1, NFKBIA, NFkB (complexo), PA2G 4, PLCG1, PTK2 B, RBL1, RBL2, R PL22, RPS3, RP S4X, RUVBL1, T CR, TUFM, UQC RC1	17	16	Ciclo Celular, Desenvolvimento Função do Tecido Conjuntivo, Doenças Infecciosas

Continuação da Tabela S6 - Redes de interação mais significativas das proteínas diferencialmente expressas em pacientes com endometriose

Grupo de pacientes com endometriose	Grupo de pacientes com endometriose	Grupo de pacientes com endometriose	Grupo de pacientes com endometriose	Grupo de pacientes com endometriose
	ANXA2,APOA1, APOA2,Actin,Akt,C3,C4A/C4B,CALR,ERK1/2,FActin,FLNA,GSN,HMGB1,HP,H PX,IgG,KRT18,LCP1,LDL,LUM ,MARCKS,MYH11,MYL12B,NO NO,OGN,P38 MAPK,PLEC,PLG,PPIA,PSMB6,SFPQ,VCL,VIM,YWHAZ,hemoglobina	42	27	Função e Manutenção Celular, Lesão do Organismo e Anormalidades, Doença Cardiovascular
Endometriose, estágio II, fase secretora	ACTN4,ANXA2, ARHGDIB,CALM1,CASP1,CASP14,CCL22,CD163,CD28,CELF1,CXCL11,CXCL12,CXCL9,ELAVL1,GNMB,GUSB,HNRNPDL,HNRNPK,IL13,IL1B,IL2,KHSRP,LGALS1,MRC1,MYL12B,PDLIM1,PKM,PRDX1,PRKCZ,RHOA,SRSF1,TF,TMSB10/TMSB4X,T P53COR1,ZNF185	20	16	Movimento Celular, Desenvolvimento e Função do Sistema Hematológico, Tráfego de Células Imunitárias

Conclusão da Tabela S6 - Redes de interação mais significativas das proteínas diferencialmente expressas em pacientes com endometriose

Grupo de pacientes com endometriose	Grupo de pacientes com endometriose	Grupo de pacientes com endometriose	Grupo de pacientes com endometriose	Grupo de pacientes com endometriose
	ACTB ,APOH,A PP, ATP5F1B , C 3,C3AR1,CASP 10, CD46 ,CDH1, CFLAR, ENO1 ,E RK1/2, HADH , H BA1/HBA2 ,HSF 1, HSP90AB1 , H SPA5 ,HSPA8, H SPD1 ,IFNG,IL1 0,IL13,IL17A,IL1 B,IL7,ITGB2, LD L , MYL6 ,PARP1, PDIA6 ,SERPIN A1,TCR,TLR3,T LR4, TUBB	21	12	Movimento Celular, Resposta Inflamatória, Doenças Infecciosas
Endometriose, estádio IV, fase secretora	26s Proteasome, AL B ,APOH, BPGM , CEBPB,CFTR,C LU, CP ,CXCL12, CXCL5,CXCL8, EIF2AK2, GAPD H , HBB , Hsp70 ,I L15,ITGB2, KRT 1,MBL2,NEIL2, NFkB (complexo), NPM 1 ,PARP1, PIGR , RNA polimerase II,SMAD7, TF ,TL R3,TP53,TP63, VCP , XRCC5 ,let- 7a-5p,mir- 128,mir-204	19	11	Resposta Inflamatória, Lesão do Organismo e Anormalidades, Ciclo Celular

FONTE: Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA)

Anexo N

Tabela S7 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase proliferativa, estágio II)

Gene regulador	Tipo de molécula	p- valor de sobreposição	Proteínas diferencialmente expressas
mir-122	microRNA	1,11E-06	ARHGAP1,CS,IQGAP1,SEPT2,TPD52L2,VIM
IL15	citocina	8,26E-06	ENO1,GAPDH,LDHA,PGD,TKT,TPI1
TCR	complexo	9,61E-06	ATP5F1B,CS,CTSB,ENO1,LDHB,NME1,SERPINA3,TPI1
MDM4	enzima	1,68E-05	KRT8,SSBP1,VIM
NEIL2	enzima	6,71E-05	ACTB,GAPDH
HNRNPU	transportador	6,71E-05	ACTB,GAPDH
SERPINA1	outros	1,31E-04	HSP90B1,HSPA5,VCP
HFE	receptor transmembrana	1,34E-04	HSP90B1,HSPA5
C3AR1	receptor acoplado a proteína G	3,32E-04	C3,HSPA5
ELANE	peptidase	4,64E-04	CTSB,MUC5AC
LDL	complexo	5,14E-04	C3,HSP90B1,HSPA5
POLR2A	enzima	6,16E-04	ACTB,GAPDH
FH	enzima	7,90E-04	LDHA,TKT
ESRRA	receptor nuclear ligante dependente	1,43E-03	LDHA,LDHB
GNA12	enzima	1,46E-03	IQGAP1,VCL,VIM
CDH1	outros	2,58E-03	ACTB,VIM
NR1H4	receptor nuclear ligante dependente	2,91E-03	LDHA,TPI1
NANOG	regulador de transcrição	3,23E-03	HSPA1A/HSPA1B,SEC22B,YWHAE
SFTPA2	outros	4,76E-03	HSPA5
KDM4B	enzima	4,76E-03	VIM
MSX2	regulador de transcrição	4,76E-03	VIM
KISS1	outros	4,76E-03	GSTP1
IL1B	citocina	5,23E-03	C3,LCP1,MUC5AC,SERPINA3
CDKN1A	kinase	5,32E-03	CTSB,VIM
CSF1	citocina	6,26E-03	HSP90B1,HSPA5
PPARG	receptor nuclear ligante dependente	6,77E-03	MUC5AC,RBP4
NFE2L2	regulador de transcrição	6,77E-03	PGD,TKT
Alpha 1 antitrypsin	grupo	9,50E-03	CTSB

Continua

Continuação da Tabela S7 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase proliferativa, estágio II)

Gene regulador	Tipo de molécula	p- valor de sobreposição	Proteínas diferencialmente expressas
SOX4	regulador de transcrição	9,50E-03	VIM
mir-940	microRNA	9,50E-03	ARHGAP1
NR1H2	receptor nuclear ligante dependente	9,50E-03	C3
NOS3	enzima	9,50E-03	GSTP1
TIMP3	outros	9,50E-03	VIM
HNF1A	regulador de transcrição	9,96E-03	ALB,SERPINA1,SERPING1
SMARCA4	regulador de transcrição	1,01E-02	GAPDH,GSTP1
IL13	citocina	1,04E-02	C3,CTSC,LTA4H,MUC5AC
CTNNB1	regulador de transcrição	1,18E-02	SERPINA1,SERPINA3,VIM
CACNA1C	canal iônico	1,42E-02	ENO1
ZDHHC2	enzima	1,42E-02	VIM
PTPN23	fosfatase	1,42E-02	VIM
WDR5	enzima	1,42E-02	VIM
GAB2	outros	1,42E-02	MUC5AC
mir-124	microRNA	1,42E-02	PTBP1
let-7a-5p (and other miRNAs w/seed GAGGUAG)	microRNA maduro	1,42E-02	VIM
ACE	peptidase	1,42E-02	LDHA
CD99	outros	1,42E-02	TUBB3
Lh	complexo	1,61E-02	ACTB,ARHGAP1,ARPC4,VCL
miR-122-5p (miRNAs w/seed GGAGUGU)	microRNA maduro	1,71E-02	CS,TPD52L2
IgG	complexo	1,76E-02	ASA1,CTSC,HSPA5
Tnf receptor	grupo	1,89E-02	C3
N-cor	grupo	1,89E-02	GSTP1
CTNND1	outros	1,89E-02	VIM
DAB2IP	outros	1,89E-02	VIM
FOXA2	regulador de transcrição	1,89E-02	ALB
MTUS1	outros	1,89E-02	VIM
EGFR	kinase	1,94E-02	HSPA5,VIM
ELAVL1	outros	2,11E-02	CALM1 (includes others),RPL13
IL6	citocina	2,19E-02	ORM1,SERPINA3
ERVW-1	outros	2,36E-02	HSPA5
SLC9A3R1	outros	2,36E-02	KRT19

Continua

Continuação da Tabela S7 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase proliferativa, estágio II)

Gene regulador	Gene regulador	Gene regulador	Gene regulador
GPI	enzima	2,36E-02	VIM
ATF6	regulador de transcrição	2,36E-02	HSPA5
FHIT	enzima	2,36E-02	VIM
CUL7	enzima	2,36E-02	VIM
MAPK7	quinase	2,36E-02	VIM
SRF	regulador de transcrição	2,46E-02	CAP1,VCL
CXCL12	citocina	2,55E-02	ARPC4,SSBP1
ESR2	receptor nuclear ligante dependente	2,82E-02	GSTP1
NRG1	fator de crescimento	2,82E-02	MUC5AC
PDE4B	enzima	2,82E-02	MUC5AC
CTCF	regulador de transcrição	2,82E-02	MUC5AC
DNAJB6	regulador de transcrição	2,82E-02	VIM
PPID	enzima	2,82E-02	VIM
SF1	regulador de transcrição	2,82E-02	MYL6
THY1	outros	3,29E-02	VIM
SIN3A	regulador de transcrição	3,29E-02	GSTP1
FGF7	fator de crescimento	3,29E-02	APRT
AREG	fator de crescimento	3,32E-02	C3,SSBP1
NEUROG1	regulador de transcrição	3,32E-02	C3,LCP1
FSH	complexo	3,40E-02	ACTB,ARHGAP1,ARPC4,VCL
PADI2	enzima	3,75E-02	VIM
DANCR	outros	3,75E-02	VIM
TNF	citokine	4,16E-02	C3,CTSC,MUC5AC,SEC22B,VCL
JAK	grupo	4,20E-02	VIM
WWC1	regulador de transcrição	4,20E-02	VIM
FZD8	receptor acoplado a proteína G	4,20E-02	VIM
RLIM	en	4,20E-02	VIM
TGFB1	enzima	4,62E-02	ALB,SERPINA1,VIM
PPARD	receptor nuclear ligante dependente	4,66E-02	YWHAE
CCAT1	outros	4,66E-02	VIM

Continua

Conclusão da Tabela S7 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase proliferativa, estágio II)

Gene regulador	Gene regulador	Gene regulador	Gene regulador
TGFA	fator de crescimento	4,66E-02	MUC5AC
TCF	grupo	4,74E-02	SERPINA1,SERPINA3

Nota: O objetivo do p-valor de sobreposição é identificar os reguladores transcricionais que são capazes de explicar as mudanças observadas na expressão gênica. O p-valor de sobreposição mede se existe uma sobreposição estatisticamente significativa entre os genes do conjunto de dados e os genes, que são regulados por um regulador de transcrição. O mesmo é calculado usando o Teste Exato de Fisher. Significância é atribuída a valores de $p < 0,01$.

Anexo O

Tabela – S8 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase proliferativa, estágio IV)

Gene regulador	Tipo de molécula	p- valor de sobreposição	Proteínas diferencialmente expressas
TCR	complex	4,76E-12	AK2,APOA4,ATP5F1B,CTSB,ECH1,ENO1,FLNA,HSPD1,IDH2,LAMP1,LDHB,MDH2,NME1,PA2G4,RPL15,RPL22,RPS3,RPS4X,TUFM,UQCRC1
mir-122	MicroRNA	0,000000253	G6PD,IQGAP1,LMNB2,NUDC,NUTF2,PKM,PPP2CA,RBM3,SEPT2
HSF1	regulador de transcrição	0,00000604	CBX3,EIF4A2,HNRNPA3,HSP90AA1,HSPH1,RAB5C,RPL22,SERPINH1
ADGRG3	receptor acoplado a proteína G	0,000157	CDC42,RHOA
Lh	complexo	0,000255	ACTN1,ACTR2,GNB1,PGRMC1,RAB1A,RAB5C,STIP1,TLN1,TPM1,TUBA1A
IL15	citocina	0,000267	ENO1,G6PD,GAPDH,LDHA,PGD,PKM,RPS6
ESRRA	receptor nuclear ligante dependente	0,000395	COL1A1,LDHA,LDHB
GATA4	regulador de transcrição	0,00048	COL1A1,COL3A1,DES,MYH9,TPM1
AR	receptor nuclear ligante dependente	0,000572	ACTR3,CKAP4,GDI1,NAP1L1,PLS3
SATB1	regulador de transcrição	0,000794	ACTG1,ACTN1,CTSD,HSP90AA1,ILF3,RPLP1
SMAD3	regulador de transcrição	0,000933	C3,COL1A1,COL3A1,DDB1
HAND2	regulador de transcrição	0,00104	COL1A1,COL3A1,DES,TPM1
TBX5	regulador de transcrição	0,00104	COL1A1,COL3A1,DES,TPM1
RUNX1	regulador de transcrição	0,00116	ALB,MYH9,MYL9
FSH	complexo	0,00153	ACTN1,ACTR2,GNB1,PGRMC1,RAB1A,RAB5C,STIP1,TLN1,TPM1,TUBA1

Continua

Continuação da Tabela – S8 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase proliferativa, estágio IV)

Gene regulador	Tipo de molécula	p- valor de sobreposição	Proteínas diferencialmente expressas
DRAP1	regulador de transcrição	0,0022	GAPDH,HIST1H1B,ILF2
AIF1	outros	0,00227	COL1A1,COL3A1
SF1	regulador de transcrição	0,00227	COL1A1,MYL6
ELAVL1	outros	0,00283	FLNA,KHSRP,RACK1,RPS6
PRMT1	enzima	0,00316	FTL,HSP90AA1
SIN3A	regulador de transcrição	0,00316	COL1A1,GSTP1
TMPO	outros	0,00316	COL1A1,COL3A1
NFE2L2	regulador de transcrição	0,0041	FTL,G6PD,PGD
CARM1	regulador de transcrição	0,00418	FTL,HSP90AA1
MYOCD	regulador de transcrição	0,00438	COL1A1,COL3A1,DES,TPM1
SMARCA4	regulador de transcrição	0,0074	GAPDH,GSTP1,TUBB
HOXA13	regulador de transcrição	0,00952	ALDH1A1,ENO1
26s Proteasome	complexo	0,0111	CTSB,CTSD,LAMP1
let-7	microRNA	0,0116	EIF4A1,NAP1L1,PA2G4,PKM
Actin	grupo	0,0125	FLNA
F Actin	complexo	0,0125	FLNA
GREM1	outros	0,0125	COL1A1
KISS1	outros	0,0125	GSTP1
LAMTOR1	outros	0,0125	RHOA
PACS2	outros	0,0125	HLA-C
TRPV4	canal iônico	0,0125	RHOA
miR-133a-3p (and other miRNAs w/seed UUGGUCC)	microRNA maduro	0,0125	FSCN1
miR-183-5p (miRNAs w/seed AUGGCAC)	microRNA maduro	0,0125	IDH2

Continua

Continuação da Tabela – S8 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase proliferativa, estágio IV)

Gene regulador	Gene regulador	Gene regulador	Gene regulador
miR-196a-5p (and other miRNAs w/seed AGGUAGU)	microRNA maduro	0,0125	COL1A1
mir-133	microRNA	0,0125	FSCN1
RBL1	regulador de transcrição	0,0148	DDB1,PA2G4
GNA12	enzima	0,0211	IQGAP1,PPP1CC,RHOA
ERG	regulador de transcrição	0,0221	APOC1,DBN1,DSTN,FLNB,HMGB1
HNF1A-AS1	outros	0,0233	HIST2H2BE,HMGB2
Alpha 1 antitrypsin	grupo	0,0249	CTSB
CSNK1A1	kinase	0,0249	HNRNPC
DDR1	kinase	0,0249	COL1A1
ELP2	outros	0,0249	HSPA4
MBD2	regulador de transcrição	0,0249	G6PD
NOS3	enzima	0,0249	GSTP1
NR1H2	receptor nuclear ligante dependente	0,0249	C3
TAZ	enzima	0,0249	CDC42
TSIX	outros	0,0249	COL1A1
mir-196	microRNA	0,0249	COL1A1
CXCL12	citocina	0,0275	CANX,HNRNPD,SSBP1
SERPINA1	outros	0,0281	HSP90B1,VCP
AHR	receptor nuclear ligante dependente	0,0334	COL1A1,COL3A1
ACE	peptidase	0,0372	LDHA
CACNA1C	canal iônico	0,0372	ENO1
HNRNPU	transportador	0,0372	GAPDH
IRX1	regulador de transcrição	0,0372	HIST2H2BE
KAT5	regulador de transcrição	0,0372	SRSF2
MRTFA	regulador de transcrição	0,0372	MYL9
NEIL2	enzima	0,0372	GAPDH
mir-124	microRNA	0,0372	PTBP1

Continua

Conclusão da Tabela – S8 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase proliferativa, estágio IV)

Gene regulador	Gene regulador	Gene regulador	Gene regulador
mir-665	microRNA	0,0372	KHSRP
AREG	fator de crescimento	0,0396	C3,HIST2H2BE,SSBP1
NANOG	regulador de transcrição	0,0429	COL3A1,HNRNPH1,YWHAE
HDAC1	regulador de transcrição	0,0478	COL1A1,GSTP1
FOXA2	regulador de transcrição	0,0492	ALB
HFE	receptor transmembranda	0,0492	HSP90B1
N-cor	grupo	0,0492	GSTP1
THBS4	outros	0,0492	COL3A1
Tnf receptor	grupo	0,0492	C3
ZBTB7B	regulador de transcrição	0,0492	COL1A1
mir-145	microRNA	0,0492	FSCN1

Nota: O objetivo do p-valor de sobreposição é identificar os reguladores transcricionais que são capazes de explicar as mudanças observadas na expressão gênica. O p-valor de sobreposição mede se existe uma sobreposição estatisticamente significativa entre os genes do conjunto de dados e os genes, que são regulados por um regulador de transcrição. O mesmo é calculado usando o Teste Exato de Fisher. Significância é atribuída a valores de $p < 0,01$.

Anexo P

Tabela S9 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase secretora, estágio II)

Gene regulador	Tipo de molécula	p- valor de sobreposição	Proteínas diferencialmente expressas
NFE2L2	regulador de transcrição	7,01E-10	FTH1,FTL,PGD,PRDX1, SOD2,TALDO1,TKT
MDM4	enzima	9,82E-07	KRT8,P4HB,SOD2,VIM
CARM1	regulador de transcrição	2,29E-05	FTH1,FTL,KRT1
IL15	citocina	1,10E-04	GAPDH,PGD,PKM,TALDO1,TKT,TPI1
GLI1	regulador de transcrição	1,87E-04	KRT19,NES,S100A9,TU FM
TCR	complexo	2,53E-04	AK2,CTSB,FLNA,GLUD 1,RPS3,TALDO1,TPI1,T UFM
BTG2	regulador de transcrição	3,35E-04	CAT,SOD2
S100A10	outros	8,30E-04	ANXA2,PLG
DNAJB6	regulador de transcrição	8,30E-04	KRT18,VIM
PRMT1	enzima	1,16E-03	FTH1,FTL
THY1	outros	1,16E-03	NES,VIM
KRT14	outros	2,70E-03	KRT1,KRT18,KRT8
EFNA5	kinase	3,38E-03	KRT1,KRT18,KRT75
CCL5	citocina	3,63E-03	PLEC,PNP,TUBB4B
EFNA4	kinase	3,88E-03	KRT1,KRT18,KRT75
EFNA3	kinase	3,88E-03	KRT1,KRT18,KRT75
ELAVL1	outros	5,34E-03	CALM1 (includes others),FLNA,KHSRP
GNA12	enzima	5,34E-03	MYH11,VCL,VIM
HNF1A	regulador de transcrição	5,39E-03	ALB,APCS,APOA2,GOT 1
KDM1A	enzima	5,55E-03	HBB,KRT18
SRF	regulador de transcrição	6,71E-03	MYH11,TUBB4B,VCL
EFNA2	kinase	6,71E-03	KRT1,KRT18,KRT75
EFNA1	outros	7,08E-03	KRT1,KRT18,KRT75
RUNX1	regulador de transcrição	7,12E-03	ALB,MYH9
SNAI1	regulador de transcrição	7,12E-03	KRT18,KRT8
Actin	grupo	7,54E-03	FLNA
Beta Secretase	grupo	7,54E-03	NES

Continua

Continuação da Tabela S9 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase secretora, estágio II)

Gene regulador	Gene regulador	Gene regulador	Gene regulador
F Actin	complexo	7,54E-03	FLNA
KDM4B	enzima	7,54E-03	VIM
MSX2	regulador de	7,54E-03	VIM
KISS1	transcrição	7,54E-03	GSTP1
SUPT16H	outros	9,81E-03	HNRNPK,KRT8
SSRP1	regulador de	9,81E-03	HNRNPK,KRT8
CDKN1A	transcrição	1,29E-02	CTSB,VIM
Alpha 1	kinase	1,50E-02	CTSB
antitrypsin	grupo	1,50E-02	PLG
JINK1/2	grupo	1,50E-02	VIM
SOX4	regulador de	1,50E-02	HBB
BCL11A	transcrição	1,50E-02	C3
NR1H2	ligand-dependent	1,50E-02	GSTP1
NOS3	nuclear receptor	1,50E-02	MYH11
HEYL	enzima	1,50E-02	KRT1
PAX6	regulador de	1,50E-02	KRT1
PIK3C2B	transcrição	1,50E-02	VIM
TIMP3	kinase	1,50E-02	APOA1
APOC3	outros	1,50E-02	BCAT1,PKM,VIM
let-7	transportador	1,59E-02	FUBP1,GAPDH,KHSRP,
TP63	microRNA	1,75E-02	KRT1,TPM1
PRL	regulador de	1,98E-02	CTSB,KRT19,SAMHD1
OLFM2	transcrição	2,24E-02	MYH11
NEIL2	citocina	2,24E-02	GAPDH
CACNA1C	outros	2,24E-02	ANXA2
ZDHHC2	enzima	2,24E-02	VIM
PTPN23	enzima	2,24E-02	VIM
WDR5	fosfatase	2,24E-02	VIM
HEY2	enzima	2,24E-02	MYH11
PDGFRB	regulador de	2,24E-02	MYH11
KL	transcrição	2,24E-02	SOD2
mir-665	kinase	2,24E-02	KHSRP
	enzima		
	microRNA		

Continua

Continuação da Tabela S9 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase secretora, estágio II)

Gene regulador	Gene regulador	Gene regulador	Gene regulador
let-7a-5p (and other miRNAs w/seed GAGGUAG)	microRNA maduro	2,24E-02	VIM
SP4	regulador de transcrição	2,24E-02	SOD2
HNRNPU	transportador	2,24E-02	GAPDH
TFAP2C	regulador de transcrição	2,24E-02	SOD2
SMARCA4	regulador de transcrição	2,41E-02	GAPDH,GSTP1
IL1B	citocina	2,47E-02	C3,GUSB,LCP1,SOD2
SATB1	regulador de transcrição	2,81E-02	ACTG1,GLRX,HBB
ERK1/2	grupo	2,98E-02	C3,CALR,PSMB6
Tnf receptor	grupo	2,98E-02	C3
N-cor	grupo	2,98E-02	GSTP1
APLN	outros	2,98E-02	CAT
CTNND1	outros	2,98E-02	VIM
DAB2IP	outros	2,98E-02	VIM
NKX2-3	regulador de transcrição	2,98E-02	MYH11
HFE	receptor	2,98E-02	TF
BCL2	transmembrana	2,98E-02	NES
FOXA2	transportador	2,98E-02	ALB
CD69	regulador de transcrição	2,98E-02	S100A9
SMO	receptor	2,98E-02	HBB
MTUS1	transmembrana	2,98E-02	VIM
CDKN2A	receptor acoplado a proteína G	3,01E-02	TPM1,VIM
HMG20A	outros	3,71E-02	KRT18
SLC9A3R1	regulador de transcrição	3,71E-02	KRT19
GPI	outros	3,71E-02	VIM
FHIT	enzima	3,71E-02	VIM
CUL7	enzima	3,71E-02	VIM
MAPK7	outros	3,71E-02	VIM
	kinase	3,71E-02	VIM

Conclusão da Tabela S9 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase secretora, estágio II)

Gene regulador	Gene regulador	Gene regulador	Gene regulador
TFAP2B	regulador de transcrição	3,71E-02	SOD2
C3AR1	receptor acoplado a proteína G	4,44E-02	C3
ESR2	receptor nuclear ligante dependente	4,44E-02	GSTP1
IL22	citocina	4,44E-02	KRT1
EIF3A	outros	4,44E-02	RAD23B
PPID	enzima	4,44E-02	VIM
FSH	complexo	4,47E-02	GOT1,KRT18,TLN1,TPM1,VCL
Lh	complexo	6,78E-02	KRT18,TLN1,TPM1,VCL

Nota: O objetivo do p-valor de sobreposição é identificar os reguladores transcricionais que são capazes de explicar as mudanças observadas na expressão gênica. O p-valor de sobreposição mede se existe uma sobreposição estatisticamente significativa entre os genes do conjunto de dados e os genes, que são regulados por um regulador de transcrição. O mesmo é calculado usando o Teste Exato de Fisher. Significância é atribuída a valores de $p < 0,01$.

Anexo Q

Tabela S10 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase secretora, estágio IV)

Gene regulador	Tipo de molécula	p- valor de sobreposição	Proteínas diferencialmente expressas
HNRNPU	transportador	0,00000685	ACTB,GAPDH
NEIL2	enzima	0,00000685	ACTB,GAPDH
HFE	receptor de membrana	0,0000137	HSPA5,TF
C3AR1	receptor acoplado a proteína G	0,0000342	C3,HSPA5
POLR2A	enzima	0,0000636	ACTB,GAPDH
TCR	complexo	0,000332	ATP5F1B,ENO1,HADH,HSPD1
SERPINA1	outros	0,000471	HSPA5,VCP
IL15	citocina	0,000481	BPGM,ENO1,GAPDH
SMARCA4	regulador de transcrição	0,0011	GAPDH,TUBB
LDL	complexo	0,00117	C3,HSPA5
ADGRV1	receptor acoplado a proteína G	0,00154	HBA1/HBA2
CYP2C9	enzima	0,00154	HBA1/HBA2
SFTPA2	outros	0,00154	HSPA5
BCL11A	regulador de transcrição	0,00307	HBB
ELP2	outros	0,00307	HSPA4
NR1H2	receptor nuclear dependente de ligante	0,00307	C3
PAX6	regulador de transcrição	0,00307	KRT1
PIK3C2B	kinase	0,00307	KRT1
CACNA1C	canal iônico	0,0046	ENO1
FOXA2	regulador de transcrição	0,00613	ALB
SMO	receptor acoplado a proteína G	0,00613	HBB
Tnf receptor	grupo	0,00613	C3
ATF6	regulador de transcrição	0,00766	HSPA5
ERVW-1	outros	0,00766	HSPA5
IL22	citocina	0,00919	KRT1
SF1	regulador de transcrição	0,00919	MYL6
CARM1	regulador de transcrição	0,0122	KRT1

Continua

Conclusão da Tabela S10 - Principais genes reguladores das proteínas diferencialmente expressas em pacientes do grupo com endometriose (fase secretora, estágio IV)

Gene regulador	Gene regulador	Gene regulador	Gene regulador
RARB	receptor nuclear dependente de ligante	0,0138	KRT1
TINCR	outros	0,0138	KRT1
STAU1	transportador	0,0153	KRT1
TAL1	regulador de transcrição	0,0153	HBB
EPO	citocina	0,0168	TF
HOXA13	regulador de transcrição	0,0183	ENO1
FGFR2	kinase	0,0198	KRT1
ATM	kinase	0,0213	ACTB
CD46	outros	0,0228	C3
KDM1A	enzima	0,0228	HBB
CDH1	outros	0,0243	ACTB
RNA polymerase II	complexo	0,0258	HBB
RUNX1	regulador de transcrição	0,0258	ALB
OSM	citocina	0,0273	HSPA5
DRAP1	regulador de transcrição	0,0318	GAPDH
TP63	regulador de transcrição	0,0373	GAPDH,KRT1
CSF1	citocina	0,0377	HSPA5
ESR1	receptor nuclear dependente de ligante	0,0407	C3

Nota: O objetivo do p-valor de sobreposição é identificar os reguladores transcricionais que são capazes de explicar as mudanças observadas na expressão gênica. O p-valor de sobreposição mede se existe uma sobreposição estatisticamente significativa entre os genes do conjunto de dados e os genes, que são regulados por um regulador de transcrição. O mesmo é calculado usando o Teste Exato de Fisher. Significância é atribuída a valores de $p < 0,01$.

8. REFERÊNCIAS

8. Referências

1. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004;364(9447):1789-99.
2. von Theobald P, Cottenet J, Iacobelli S, Quantin C. Epidemiology of Endometriosis in France: A Large, Nation-Wide Study Based on Hospital Discharge Data. *Biomed Research International*. 2016;6.
3. Janssen EB, Rijkers ACM, Hoppenbrouwers K, Meuleman C, D'Hooghe TM. Prevalence of endometriosis diagnosed by laparoscopy in adolescents with dysmenorrhea or chronic pelvic pain: a systematic review. *Human Reproduction Update*. 2013;19(5):570-82.
4. Bellelis P, Dias JA, Podgaec S, Gonzales M, Baracat EC, Abrao MS. EPIDEMIOLOGICAL AND CLINICAL ASPECTS OF PELVIC ENDOMETRIOSIS - A CASE SERIES. *Revista Da Associacao Medica Brasileira*. 2010;56(4):467-71.
5. Arruda MS, Petta CA, Abrao MS, Benetti-Pinto CL. Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women. *Human Reproduction*. 2003;18(4):756-9.
6. Fuldeore M, Yang HB, Du EX, Soliman AM, Wu EQ, Winkel C. Healthcare utilization and costs in women diagnosed with endometriosis before and after diagnosis: a longitudinal analysis of claims databases. *Fertility and Sterility*. 2015;103(1):163-71.
7. Fourquet J, Gao X, Zavala D, Orengo JC, Abac S, Ruiz A, et al. Patients' report on how endometriosis affects health, work, and daily life. *Fertility and Sterility*. 2010;93(7):2424-8.
8. McLeod BS, Retzliff MG. Epidemiology of Endometriosis: An Assessment of Risk Factors. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 2010;53(2):389-96.
9. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1927;14:422-69.
10. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. RETROGRADE MENSTRUATION IN HEALTHY WOMEN AND IN PATIENTS WITH ENDOMETRIOSIS. *Obstetrics and Gynecology*. 1984;64(2):151-4.
11. Robboy SJ, Bean SM. Pathogenesis of endometriosis. *Reproductive Biomedicine Online*. 2010;21(1):4-5.
12. Batt RE, Mitwally MF. Endometriosis from thelarche to midteens: pathogenesis and prognosis, prevention and pedagogy. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2003;16(6):337-47.
13. Borrelli GM, Abrao MS, Taube ET, Darb-Esfahani S, Kohler C, Kaufmann AM, et al. Immunohistochemical Investigation of Metastasis-Related Chemokines in Deep-Infiltrating Endometriosis and Compromised Pelvic Sentinel Lymph Nodes. *Reproductive Sciences*. 2015;22(12):1632-42.
14. McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Human Reproduction Update*. 2000;6(1):45-55.
15. Girling JE, Rogers PA. Recent advances in endometrial angiogenesis research. *Angiogenesis*. 2005;8(2):89-99.
16. Pupo-Nogueira A, de Oliveira RM, Petta CA, Podgaec S, Dias JA, Abrao MS. Vascular endothelial growth factor concentrations in the serum and

- peritoneal fluid of women with endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet*. 2007;99(1):33-7.
17. Fairbanks F, Abrao MS, Podgaec S, Dias JA, de Oliveira RM, Rizzo LV. Interleukin-12 but not interleukin-18 is associated with severe endometriosis. *Fertility and Sterility*. 2009;91(2):320-4.
 18. Podgaec S, Abrao MS, Dias JA, Rizzo LV, de Oliveira RM, Baracat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Human Reproduction*. 2007;22(5):1373-9.
 19. Matarese G, De Placido G, Nikas Y, Alviggi C. Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease? *Trends in Molecular Medicine*. 2003;9(5):223-8.
 20. Sapkota Y, Steinthorsdottir V, Morris AP, Fassbender A, Rahmioglu N, De Vivo I, et al. Meta-analysis identifies five novel loci associated with endometriosis highlighting key genes involved in hormone metabolism. *Nature Communications*. 2017;8:12.
 21. Bellelis P, Podgaec S, Abrao MS. Environmental factors and endometriosis. *Revista Da Associacao Medica Brasileira*. 2011;57(4):456-61.
 22. Canis M, Donnez JG, Guzick DS, Halme JK, Rock JA, Schenken RS, et al. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertility and Sterility*. 1997;67(5):817-21.
 23. Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril*. 1990;53(6):978-83.
 24. Chapron C, Chopin N, Borghese B, Foulot H, Dousset B, Vacher-Lavenu MC, et al. Deeply infiltrating endometriosis: pathogenetic implications of the anatomical distribution. *Human Reproduction*. 2006;21(7):1839-45.
 25. Abrao MS, Podgaec S, Dias JA, Averbach M, Garry R, Silva LFF, et al. Deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum and lymph nodes. *Fertility and Sterility*. 2006;86(3):543-7.
 26. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertility and Sterility*. 1997;68(4):585-96.
 27. Ruffo G, Scopelliti F, Scioscia M, Ceccaroni M, Mainardi P, Minelli L. Laparoscopic colorectal resection for deep infiltrating endometriosis: analysis of 436 cases. *Surgical Endoscopy and Other Interventional Techniques*. 2010;24(1):63-7.
 28. Chapron C, Santulli P, de Ziegler D, Noel JC, Anaf V, Streuli I, et al. Ovarian endometrioma: severe pelvic pain is associated with deeply infiltrating endometriosis. *Human Reproduction*. 2012;27(3):702-11.
 29. Seracchioli R, Poggioli G, Pierangeli F, Manuzzi L, Gualerzi B, Savelli L, et al. Surgical outcome and long-term follow up after laparoscopic rectosigmoid resection in women with deep infiltrating endometriosis. *Bjog-an International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2007;114(7):889-95.
 30. Wills HJ, Reid GD, Cooper MJW, Morgan M. Fertility and pain outcomes following laparoscopic segmental bowel resection for colorectal endometriosis: A review. *Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2008;48(3):292-5.

31. Coronado C, Franklin RR, Lotze EC, Bailey HR, Valdes CT. SURGICAL-TREATMENT OF SYMPTOMATIC COLORECTAL ENDOMETRIOSIS. *Fertility and Sterility*. 1990;53(3):411-20.
32. Remorgida V, Ferrero S, Fulcheri E, Ragni N, Martin DC. Bowel endometriosis: Presentation, diagnosis, and treatment. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2007;62(7):461-70.
33. De Cicco C, Corona R, Schonman R, Mailova K, Ussia A, Koninckx PR. Bowel resection for deep endometriosis: a systematic review. *Bjog-an International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2011;118(3):285-91.
34. Dubernard G, Rouzier R, David-Montefiore E, Bazot M, Darai E. Use of the SF-36 questionnaire to predict quality-of-life improvement after laparoscopic colorectal resection for endometriosis. *Human Reproduction*. 2008;23(4):846-51.
35. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Human Reproduction*. 2005;20(10):2698-704.
36. Podgaec S, Berbel B, Dias JJ, Fernandes L, Abrão M. There is a relation between the symptoms referred by patients with endometriosis and the site of the disease. *J Minim Invasive Gynecol*. 2009. p. 108-9.
37. Chamie LP, Blasbalg R, Goncalves MOC, Carvalho FM, Abrao MS, de Oliveira IS. Accuracy of magnetic resonance imaging for diagnosis and preoperative assessment of deeply infiltrating endometriosis. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2009;106(3):198-201.
38. Goncalves MO, Dias JA, Podgaec S, Averbach M, Abrao MS. Transvaginal ultrasound for diagnosis of deeply infiltrating endometriosis. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2009;104(2):156-60.
39. Goncalves MOD, Podgaec S, Dias JA, Gonzalez M, Abrao MS. Transvaginal ultrasonography with bowel preparation is able to predict the number of lesions and rectosigmoid layers affected in cases of deep endometriosis, defining surgical strategy. *Human Reproduction*. 2010;25(3):665-71.
40. Ros C, Martínez-Serrano MJ, Rius M, Abrao MS, Munrós J, Martínez-Zamora M, et al. Bowel Preparation Improves the Accuracy of Transvaginal Ultrasound in the Diagnosis of Rectosigmoid Deep Infiltrating Endometriosis: A Prospective Study. *J Minim Invasive Gynecol*. 2017.
41. O DF, Flores I, Waelkens E, D'Hooghe T. Noninvasive diagnosis of endometriosis: Review of current peripheral blood and endometrial biomarkers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;50:72-83.
42. Poliness AE, Healey MG, Brennecke SR, Moses EK. Proteomic approaches in endometriosis research. *Proteomics*. 2004;4(7):1897-902.
43. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, et al. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio-Technology*. 1996;14(1):61-5.
44. James P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1997;30(4):279-331.
45. Gstaiger M, Aebersold R. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(9):617-27.

46. Zhang YY, Fonslow BR, Shan B, Baek MC, Yates JR. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chemical Reviews*. 2013;113(4):2343-94.
47. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2001;69(3):89-95.
48. Zhang XW, Li L, Wei D, Chen F. Moving cancer diagnostics from bench to bedside. *Trends in Biotechnology*. 2007;25(4):166-73.
49. Shiromizu T, Kume H, Ishida M, Adachi J, Kano M, Matsubara H, et al. Quantitation of putative colorectal cancer biomarker candidates in serum extracellular vesicles by targeted proteomics. *Scientific Reports*. 2017;7:13.
50. Ferreira TAR, de Andrade HM, de Padua PM, Carvalho MD, Pires SD, Oliveira IHR, et al. Identification of potential biomarkers for systemic lupus erythematosus diagnosis using two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE) and mass spectrometry. *Autoimmunity*. 2017;50(4):247-56.
51. El Karkouri K, Kowalczywska M, Armstrong N, Azza S, Fournier PE, Raoult D. Multi-omics Analysis Sheds Light on the Evolution and the Intracellular Lifestyle Strategies of Spotted Fever Group Rickettsia spp. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:16.
52. Wood GC, Chu X, Argyropoulos G, Benotti P, Rolston D, Mirshahi T, et al. A multi-component classifier for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) based on genomic, proteomic, and phenomic data domains. *Scientific Reports*. 2017;7:9.
53. Ma-Lauer Y, Carbajo-Lozoya J, Hein MY, Mueller MA, Deng W, Lei J, et al. p53 down-regulates SARS coronavirus replication and is targeted by the SARS-unique domain and PLpro via E3 ubiquitin ligase RCHY1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(35):E5192-E201.
54. Musunuru K, Ingelsson E, Fornage M, Liu P, Murphy AM, Newby LK, et al. The Expressed Genome in Cardiovascular Diseases and Stroke: Refinement, Diagnosis, and Prediction A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation-Cardiovascular Genetics*. 2017;10(4):E1-E24.
55. Chun N, Wyatt CM, He JC. Identification of a protective proteomic signature and a potential therapeutic target in diabetic nephropathy. *Kidney International*. 2017;92(4):780-1.
56. May KE, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM. Endometrial alterations in endometriosis: a systematic review of putative biomarkers. *Human Reproduction Update*. 2011;17(5):637-53.
57. Anderson NL. The Clinical Plasma Proteome: A Survey of Clinical Assays for Proteins in Plasma and Serum. *Clinical Chemistry*. 2010;56(2):177-85.
58. Hanash SM, Pitteri SJ, Faca VM. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature*. 2008;452(7187):571-9.
59. Zhang Z, Chan DW. The Road from Discovery to Clinical Diagnostics: Lessons Learned from the First FDA-Cleared In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assay of Proteomic Biomarkers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2010;19(12):2995-9.

60. Westermeier R. Looking at proteins from two dimensions: a review on five decades of 2D electrophoresis. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2014;120(5):168-72.
61. Scherp P, Ku G, Coleman L, Kheterpal I. Gel-based and gel-free proteomic technologies. *Methods Mol Biol*. 2011;702:163-90.
62. Siva AB, Srivastava P, Shivaji S. Understanding the pathogenesis of endometriosis through proteomics: Recent advances and future prospects. *Proteomics Clinical Applications*. 2014;8(1-2):86-98.
63. Carvalho P, Fischer J, Degraeve W. Marcadores séricos e espectrometria de massa no diagnóstico do câncer. *J Bras Patol Med Lab* 2006. p. 431-6
64. Karas M. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Process* 1987. p. 53-68.
65. Meehan KL, Rainczuk A, Salamonsen LA, Stephens AN. Proteomics and the search for biomarkers of female reproductive diseases. *Reproduction*. 2010;140(4):505-19.
66. Yates JR. The revolution and evolution of shotgun proteomics for large-scale proteome analysis. *J Am Chem Soc*. 2013;135(5):1629-40.
67. Yates JR. Mass spectral analysis in proteomics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2004;33:297-316.
68. Michalski A, Damoc E, Lange O, Denisov E, Nolting D, Muller M, et al. Ultra High Resolution Linear Ion Trap Orbitrap Mass Spectrometer (Orbitrap Elite) Facilitates Top Down LC MS/MS and Versatile Peptide Fragmentation Modes. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(3):11.
69. Van Gorp T, Cadron I, Daemen A, De Moor B, Waelkens E, Vergote I. Proteomic biomarkers predicting lymph node involvement in serum of cervical cancer patients. Limitations of SELDI-TOF MS. *Proteome Science*. 2012;10:8.
70. Ferrero S, Gillott DJ, Remorgida V, Ragni N, Venturini PL, Grudzinskas JG. Proteomics technologies in endometriosis. *Expert Review of Proteomics*. 2008;5(5):705-14.
71. Liu E, Nisenblat V, Farquhar C, Fraser I, Bossuyt PMM, Johnson N, et al. Urinary biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015(12):95.
72. Nisenblat V, Bossuyt PMM, Shaikh R, Farquhar C, Jordan V, Scheffers CS, et al. Blood biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016(5):647.
73. Gupta D, Hull ML, Fraser I, Miller L, Bossuyt PMM, Johnson N, et al. Endometrial biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016(4):297.
74. Fassbender A, Verbeeck N, Bornigen D, Kyama CM, Bokor A, Vodolazkaia A, et al. Combined mRNA microarray and proteomic analysis of eutopic endometrium of women with and without endometriosis. *Human Reproduction*. 2012;27(7):2020-9.
75. Wang L, Zheng W, Yu JK, Jiang WZ, Mu L, Zhang SZ. Artificial neural networks combined with surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectra distinguish endometriosis from healthy population. *Fertil Steril*. 2007;88(6):1700-2.
76. Mangler M, Loddenkemper C, Lanowska M, Bartley J, Schneider A, Kohler C. Histopathology-based combined surgical approach to rectovaginal

- endometriosis. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2008;103(1):59-64.
77. Wang L, Zheng W, Ding XY, Yu JK, Jiang WZ, Zhang SZ. Identification biomarkers of eutopic endometrium in endometriosis using artificial neural networks and protein fingerprinting. *Fertility and Sterility*. 2010;93(7):2460-2.
 78. Gross JH. Direct analysis in real time--a critical review on DART-MS. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(1):63-80.
 79. Xie J, Shen K, Lenchine RV, Gethings LA, Trim PJ, Snel MF, et al. Eukaryotic elongation factor 2 kinase upregulates the expression of proteins implicated in cell migration and cancer cell metastasis. *Int J Cancer*. 2018;142(9):1865-77.
 80. Zhang X, Hu L, Du M, Wei X, Zhang J, Hui Y, et al. Eukaryotic Elongation Factor 2 (eEF2) is a Potential Biomarker of Prostate Cancer. *Pathol Oncol Res*. 2018;24(4):885-90.
 81. Shi N, Chen X, Liu R, Wang D, Su M, Wang Q, et al. Eukaryotic elongation factors 2 promotes tumor cell proliferation and correlates with poor prognosis in ovarian cancer. *Tissue Cell*. 2018;53:53-60.
 82. Pott LL, Hagemann S, Reis H, Lorenz K, Bracht T, Herold T, et al. Eukaryotic elongation factor 2 is a prognostic marker and its kinase a potential therapeutic target in HCC. *Oncotarget*. 2017;8(7):11950-62.
 83. Arumugam T, Logsdon CD. S100P: a novel therapeutic target for cancer. *Amino Acids*. 2011;41(4):893-9.
 84. Hapangama DK, Raju RS, Valentijn AJ, Barraclough D, Hart A, Turner MA, et al. Aberrant expression of metastasis-inducing proteins in ectopic and matched eutopic endometrium of women with endometriosis: implications for the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod*. 2012;27(2):394-407.
 85. Kim SY, Kim HJ, Kim DH, Han JH, Byeon HK, Lee K, et al. HSPA5 negatively regulates lysosomal activity through ubiquitination of MUL1 in head and neck cancer. *Autophagy*. 2018;14(3):385-403.
 86. Zhang Y, Li C, Xue W, Zhang M, Li Z. Frequent Mutations in Natural Killer/T Cell Lymphoma. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(1):1-16.
 87. Qiu X, Guan X, Liu W, Zhang Y. DAL-1 attenuates epithelial to mesenchymal transition and metastasis by suppressing HSPA5 expression in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2017;38(5):3103-13.
 88. Fang J, Wang H, Liu Y, Ding F, Ni Y, Shao S. High KRT8 expression promotes tumor progression and metastasis of gastric cancer. *Cancer Sci*. 2017;108(2):178-86.
 89. Pearce CL, Templeman C, Rossing MA, Lee A, Near AM, Webb PM, et al. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Lancet Oncol*. 2012;13(4):385-94.
 90. Anifantaki F, Boutas I, Kalampokas T, Kalampokas E, Sofoudis C, Salakos N. Association of endometriosis and breast cancer: mini review of the literature. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;293(1):5-10.
 91. Shao QQ, Zhang TP, Zhao WJ, Liu ZW, You L, Zhou L, et al. Filamin A: Insights into its Exact Role in Cancers. *Pathol Oncol Res*. 2016;22(2):245-52.
 92. Farland LV, Lorrain S, Missmer SA, Dartois L, Cervenka I, Savoye I, et al. Endometriosis and the risk of skin cancer: a prospective cohort study. *Cancer Causes Control*. 2017;28(10):1011-9.

93. Jin YZ, Pei CZ, Wen LY. FLNA is a predictor of chemoresistance and poor survival in cervical cancer. *Biomark Med.* 2016;10(7):711-9.
94. Vastrad C, Vastrad B. Bioinformatics analysis of gene expression profiles to diagnose crucial and novel genes in glioblastoma multiform. *Pathol Res Pract.* 2018;214(9):1395-461.
95. Artero-Castro A, Castellvi J, García A, Hernández J, Ramón y Cajal S, Leonart ME. Expression of the ribosomal proteins Rplp0, Rplp1, and Rplp2 in gynecologic tumors. *Hum Pathol.* 2011;42(2):194-203.
96. Zhang E, He X, Zhang C, Su J, Lu X, Si X, et al. A novel long noncoding RNA HOXC-AS3 mediates tumorigenesis of gastric cancer by binding to YBX1. *Genome Biol.* 2018;19(1):154.
97. Ahrens T, Silveira CG, Banz-Jansen C, Rody A, Hornung D. Evaluation of YB-1 levels in patients with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2015;191:68-71.
98. Hu X, Li YQ, Li QG, Ma YL, Peng JJ, Cai SJ. Osteoglycin-induced VEGF Inhibition Enhances T Lymphocytes Infiltrating in Colorectal Cancer. *EBioMedicine.* 2018;34:35-45.
99. Huang P, Cai Y, Zhao B, Cui L. Roles of NUCKS1 in Diseases: Susceptibility, Potential Biomarker, and Regulatory Mechanisms. *Biomed Res Int.* 2018;2018:7969068.
100. Saha SK, Kim K, Yang GM, Choi HY, Cho SG. Cytokeratin 19. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5).
101. Cai X, Ding H, Liu Y, Pan G, Li Q, Yang Z, et al. Expression of HMGB2 indicates worse survival of patients and is required for the maintenance of Warburg effect in pancreatic cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2017;49(2):119-27.
102. Machado DE, Abrao MS, Berardo PT, Takiya CM, Nasciutti LE. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. *Fertil Steril.* 2008;90(1):148-55.
103. Vigano P, Candiani M, Monno A, Giacomini E, Vercellini P, Somigliana E. Time to redefine endometriosis including its pro-fibrotic nature. *Hum Reprod.* 2018;33(3):347-52.
104. Kaur S, Smith LM, Patel A, Menning M, Watley DC, Malik SS, et al. A Combination of MUC5AC and CA19-9 Improves the Diagnosis of Pancreatic Cancer: A Multicenter Study. *Am J Gastroenterol.* 2017;112(1):172-83.
105. Zhang X, Huang Y, Shi X. Emerging roles of lysine methylation on non-histone proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(22):4257-72.
106. Onstenk W, Sieuwerts AM, Mostert B, Lalmahomed Z, Bolt-de Vries JB, van Galen A, et al. Molecular characteristics of circulating tumor cells resemble the liver metastasis more closely than the primary tumor in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016;7(37):59058-69.
107. Zalutskii IV, Lukianova NY, Storchai DM, Burlaka AP, Shvets YV, Borikun TV, et al. Influence of exogenous lactoferrin on the oxidant/antioxidant balance and molecular profile of hormone receptor-positive and -negative human breast cancer cells in vitro. *Exp Oncol.* 2017;39(2):106-11.
108. Bar-Gil Shitrit A, Koslowsky B, Livovsky DM, Shitrit D, Paz K, Adar T, et al. A prospective study of fecal calprotectin and lactoferrin as predictors of small

- bowel Crohn's disease in patients undergoing capsule endoscopy. *Scand J Gastroenterol*. 2017;52(3):328-33.
109. Luo G, Zhou Y, Yi W, Yi H. Lactotransferrin expression is downregulated and affects the mitogen-activated protein kinase pathway in gastric cancer. *Oncol Lett*. 2015;9(5):2409-13.
 110. Polak G, Wertel I, Tarkowski R, Morawska D, Kotarski J. Decreased lactoferrin levels in peritoneal fluid of women with minimal endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2007;131(1):93-6.
 111. Sherwin JR, Hastings JM, Jackson KS, Mavrogianis PA, Sharkey AM, Fazleabas AT. The endometrial response to chorionic gonadotropin is blunted in a baboon model of endometriosis. *Endocrinology*. 2010;151(10):4982-93.
 112. Yang J, Xiong X, Liu S, Zhu J, Luo M, Liu L, et al. Identification of novel serum peptides biomarkers for female breast cancer patients in Western China. *Proteomics*. 2016;16(6):925-34.
 113. Honda K, Katzke VA, Hüsing A, Okaya S, Shoji H, Onidani K, et al. CA19-9 and apolipoprotein-A2 isoforms as detection markers for pancreatic cancer: a prospective evaluation. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1877-87.
 114. Wang H, Luo C, Zhu S, Fang H, Gao Q, Ge S, et al. Serum peptidome profiling for the diagnosis of colorectal cancer: discovery and validation in two independent cohorts. *Oncotarget*. 2017;8(35):59376-86.
 115. Shi F, Wu H, Qu K, Sun Q, Li F, Shi C, et al. Identification of serum proteins AHSG, FGA and APOA-I as diagnostic biomarkers for gastric cancer. *Clin Proteomics*. 2018;15:18.
 116. Chen Y, Xiong X, Wang Y, Zhao J, Shi H, Zhang H, et al. Proteomic Screening for Serum Biomarkers for Cervical Cancer and Their Clinical Significance. *Med Sci Monit*. 2019;25:288-97.
 117. Zhao Y, Liu YN, Li Y, Tian L, Ye X, Cui H, et al. Identification of biomarkers for endometriosis using clinical proteomics. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(4):520-7.
 118. Hu B, Jiang D, Chen Y, Wei L, Zhang S, Zhao F, et al. High CHMP4B expression is associated with accelerated cell proliferation and resistance to doxorubicin in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*. 2015;36(4):2569-81.
 119. Wang Y, Li Y, Chen Z, Wang T, Gu J, Wu X, et al. The Evaluation of Colorectal Cancer Risk in Serum by anti-DESMIN-conjugated CdTe/CdS Quantum Dots. *Clin Lab*. 2017;63(3):579-86.
 120. Hwang H, Matsuo K, Duncan K, Pakzmir E, Pham HQ, Correa A, et al. Immunohistochemical panel to differentiate endometrial stromal sarcoma, uterine leiomyosarcoma and leiomyoma: something old and something new. *J Clin Pathol*. 2015;68(9):710-7.
 121. van Kaam KJ, Schouten JP, Nap AW, Dunselman GA, Groothuis PG. Fibromuscular differentiation in deeply infiltrating endometriosis is a reaction of resident fibroblasts to the presence of ectopic endometrium. *Hum Reprod*. 2008;23(12):2692-700.
 122. Yuan Y, Zhang Y, Yao S, Shi H, Huang X, Li Y, et al. The translation initiation factor eIF3i up-regulates vascular endothelial growth factor A, accelerates cell proliferation, and promotes angiogenesis in embryonic development and tumorigenesis. *J Biol Chem*. 2014;289(41):28310-23.

123. Zhang Y, Wang P, Zhang Q, Yao X, Zhao L, Liu Y, et al. eIF3i activity is critical for endothelial cells in tumor induced angiogenesis through regulating VEGFR and ERK translation. *Oncotarget*. 2017;8(12):19968-79.
124. Abrao MS, Podgaec S, Dias JA, Averbach M, Garry R, Ferraz Silva LF, et al. Deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum and lymph nodes. *Fertil Steril*. 2006;86(3):543-7.
125. Lee SW. H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer. *Nat Med*. 1996;2(7):776-82.
126. Kuphal S, Martyn AC, Pedley J, Crowther LM, Bonazzi VF, Parsons PG, et al. H-cadherin expression reduces invasion of malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2009;22(3):296-306.
127. Zhang HZ, Li XH, Zhang X, Zhang ZY, Meng YL, Xu SW, et al. PINCH protein expression in normal endometrium, atypical endometrial hyperplasia and endometrioid endometrial carcinoma. *Chemotherapy*. 2010;56(4):291-7.
128. Wang MJ, Ping J, Li Y, Holmqvist A, Adell G, Arbmán G, et al. Prognostic Significance and Molecular Features of Colorectal Mucinous Adenocarcinomas: A Strobe-Compliant Study. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(51):e2350.
129. Saeki N, Saito A, Sugaya Y, Amemiya M, Ono H, Komatsuzaki R, et al. Chromatin Immunoprecipitation and DNA Sequencing Identified a LIMS1/ILK Pathway Regulated by LMO1 in Neuroblastoma. *Cancer Genomics Proteomics*. 2018;15(3):165-74.
130. Tsiniás G, Nikou S, Papadas T, Pitsos P, Papadaki H, Bravou V. High PINCH1 Expression in Human Laryngeal Carcinoma Associates with Poor Prognosis. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2018;2018:2989635.
131. Huang C, Li Y, Li Z, Xu Y, Li N, Ge Y, et al. LIMS1 Promotes Pancreatic Cancer Cell Survival Under Oxygen-Glucose Deprivation Conditions by Enhancing HIF1A Protein Translation. *Clin Cancer Res*. 2019.
132. Matalliotaki C, Matalliotakis M, Zervou MI, Trivli A, Matalliotakis I, Mavromatidis G, et al. Co-existence of endometriosis with 13 non-gynecological co-morbidities: Mutation analysis by whole exome sequencing. *Mol Med Rep*. 2018;18(6):5053-7.
133. Manara MC, Terracciano M, Mancarella C, Sciandra M, Guerzoni C, Pasello M, et al. CD99 triggering induces methuosis of Ewing sarcoma cells through IGF-1R/RAS/Rac1 signaling. *Oncotarget*. 2016;7(48):79925-42.
134. Chung SS, Eng WS, Hu W, Khalaj M, Garrett-Bakelman FE, Tavakkoli M, et al. CD99 is a therapeutic target on disease stem cells in myeloid malignancies. *Sci Transl Med*. 2017;9(374).
135. Kingwell K. Cancer: CD99 marks malignant myeloid stem cells. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(3):166.
136. Zhou G, Yang W, Yu L, Yu T, Liu Z. CD99 refers to the activity of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2017;52(3):359-64.
137. Yang Z, Zhuang L, Szatmary P, Wen L, Sun H, Lu Y, et al. Upregulation of heat shock proteins (HSPA12A, HSP90B1, HSPA4, HSPA5 and HSPA6) in tumour tissues is associated with poor outcomes from HBV-related early-stage hepatocellular carcinoma. *Int J Med Sci*. 2015;12(3):256-63.
138. Khalil AA, Kabapy NF, Deraz SF, Smith C. Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochim Biophys Acta*. 2011;1816(2):89-104.

139. Haase M, Fitze G. HSP90AB1: Helping the good and the bad. *Gene*. 2016;575(2 Pt 1):171-86.
140. Boussadia Z, Lamberti J, Mattei F, Pizzi E, Puglisi R, Zanetti C, et al. Acidic microenvironment plays a key role in human melanoma progression through a sustained exosome mediated transfer of clinically relevant metastatic molecules. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):245.
141. Wang H, Deng G, Ai M, Xu Z, Mou T, Yu J, et al. Hsp90ab1 stabilizes LRP5 to promote epithelial-mesenchymal transition via activating of AKT and Wnt/ β -catenin signaling pathways in gastric cancer progression. *Oncogene*. 2019;38(9):1489-507.
142. Guery L, Benikhlef N, Gautier T, Paul C, Jego G, Dufour E, et al. Fine-tuning nucleophosmin in macrophage differentiation and activation. *Blood*. 2011;118(17):4694-704.
143. Fan X, Wen L, Li Y, Lou L, Liu W, Zhang J. The expression profile and prognostic value of APE/Ref-1 and NPM1 in high-grade serous ovarian adenocarcinoma. *APMIS*. 2017;125(10):857-62.
144. Zhou Y, Shen J, Xia L, Wang Y. Estrogen mediated expression of nucleophosmin 1 in human endometrial carcinoma clinical stages through estrogen receptor- α signaling. *Cancer Cell Int*. 2014;14(1):540.
145. Liu Y, Zhang F, Zhang XF, Qi LS, Yang L, Guo H, et al. Expression of nucleophosmin/NPM1 correlates with migration and invasiveness of colon cancer cells. *J Biomed Sci*. 2012;19:53.
146. Li C, Kato M, Shiue L, Shively JE, Ares M, Lin RJ. Cell type and culture condition-dependent alternative splicing in human breast cancer cells revealed by splicing-sensitive microarrays. *Cancer Res*. 2006;66(4):1990-9.
147. Lu JJ, Lu DZ, Chen YF, Dong YT, Zhang JR, Li T, et al. Proteomic analysis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells treated with platycodin D. *Chin J Nat Med*. 2015;13(9):673-9.
148. Soudy R, Etayash H, Bahadorani K, Lavasanifar A, Kaur K. Breast Cancer Targeting Peptide Binds Keratin 1: A New Molecular Marker for Targeted Drug Delivery to Breast Cancer. *Mol Pharm*. 2017;14(3):593-604.
149. Liu K, Tang Z, Huang A, Chen P, Liu P, Yang J, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes cancer growth and metastasis through upregulation of SNAIL expression. *Int J Oncol*. 2017;50(1):252-62.
150. Klettner A, Tholey A, Wiegandt A, Richert E, Nölle B, Deuschl G, et al. Reduction of GAPDH in lenses of Parkinson's disease patients: A possible new biomarker. *Mov Disord*. 2017;32(3):459-62.
151. Tsviliana A, Mayr D, Kuhn C, Kunze S, Mylonas I, Jeschke U, et al. Determination of glycodelin-A expression correlated to grading and staging in ovarian carcinoma tissue. *Anticancer Res*. 2010;30(5):1637-40.
152. Lenhard M, Heublein S, Kunert-Keil C, Vrekoussis T, Lomba I, Ditsch N, et al. Immunosuppressive Glycodelin A is an independent marker for poor prognosis in endometrial cancer. *BMC Cancer*. 2013;13:616.
153. Kölbl AC, Jeschke U, Dian D, Friesen K, Andergassen U. Glycodelin A - a famous lipocalin and its role in breast cancer. *Anticancer Res*. 2014;34(3):1079-85.
154. Schneider MA, Granzow M, Warth A, Schnabel PA, Thomas M, Herth FJ, et al. Glycodelin: A New Biomarker with Immunomodulatory Functions in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(15):3529-40.

155. Mosbah A, Nabel Y, Khashaba E. Interleukin-6, intracellular adhesion molecule-1, and glycodelin A levels in serum and peritoneal fluid as biomarkers for endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet*. 2016;134(3):247-51.
156. Carroll MC. The complement system in B cell regulation. *Mol Immunol*. 2004;41(2-3):141-6.
157. Agatea L, Crotti S, Ragazzi E, Bedin C, Urso E, Mammi I, et al. Peptide Patterns as Discriminating Biomarkers in Plasma of Patients With Familial Adenomatous Polyposis. *Clin Colorectal Cancer*. 2016;15(3):e75-92.
158. Swiatly A, Horala A, Hajduk J, Matysiak J, Nowak-Markwitz E, Kokot ZJ. MALDI-TOF-MS analysis in discovery and identification of serum proteomic patterns of ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2017;17(1):472.
159. Ye J, Ren Y, Chen J, Song W, Chen C, Cai S, et al. Prognostic Significance of Preoperative and Postoperative Complement C3 Depletion in Gastric Cancer: A Three-Year Survival Investigation. *Biomed Res Int*. 2017;2017:2161840.
160. Kwak JW, Laskowski J, Li HY, McSharry MV, Sippel TR, Bullock BL, et al. Complement Activation via a C3a Receptor Pathway Alters CD4. *Cancer Res*. 2018;78(1):143-56.
161. Ferrero S, Gillott DJ, Remorgida V, Anserini P, Ragni N, Grudzinskas JG. Proteomic analysis of peritoneal fluid in fertile and infertile women with endometriosis. *J Reprod Med*. 2009;54(1):32-40.
162. Kopelman A, Girão MJ, Bonetti TC, Carvalho CV, da Silva ID, Schor E. Analysis of Gene Expression in the Endocervical Epithelium of Women With Deep Endometriosis. *Reprod Sci*. 2016;23(9):1269-74.
163. Fu Q, Jiang Y, Zhang D, Liu X, Guo J, Zhao J. Valosin-containing protein (VCP) promotes the growth, invasion, and metastasis of colorectal cancer through activation of STAT3 signaling. *Mol Cell Biochem*. 2016;418(1-2):189-98.
164. Ocak S, Pedchenko TV, Chen H, Harris FT, Qian J, Polosukhin V, et al. Loss of polymeric immunoglobulin receptor expression is associated with lung tumourigenesis. *Eur Respir J*. 2012;39(5):1171-80.
165. Berntsson J, Lundgren S, Nodin B, Uhlén M, Gaber A, Jirström K. Expression and prognostic significance of the polymeric immunoglobulin receptor in epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2014;7:26.
166. Fristedt R, Elebro J, Gaber A, Jonsson L, Heby M, Yudina Y, et al. Reduced expression of the polymeric immunoglobulin receptor in pancreatic and periampullary adenocarcinoma signifies tumour progression and poor prognosis. *PLoS One*. 2014;9(11):e112728.
167. Liu F, Ye P, Bi T, Teng L, Xiang C, Wang H, et al. COLORECTAL Polymeric Immunoglobulin Receptor Expression is Correlated with Hepatic Metastasis and Poor Prognosis in Colon Carcinoma Patients with Hepatic Metastasis. *Hepatogastroenterology*. 2014;61(131):652-9.
168. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
169. Melin A, Lundholm C, Malki N, Swahn ML, Sparen P, Bergqvist A. Endometriosis as a prognostic factor for cancer survival. *Int J Cancer*. 2011;129(4):948-55.

170. Melin A, Sparén P, Persson I, Bergqvist A. Endometriosis and the risk of cancer with special emphasis on ovarian cancer. *Hum Reprod.* 2006;21(5):1237-42.
171. Pabalan N, Sukcharoensin S, Butthongkomvong K, Jarjanazi H, Thitapakorn V. Expression and Serum Levels of Mucin 5AC (MUC5AC) as a Biomarker for Cholangiocarcinoma: a Meta-analysis. *J Gastrointest Cancer.* 2019;50(1):54-61.