EDUARDO HIDEKI MIYADAHIRA

**Efeito da remoção cirúrgica das lesões de
endometriose profunda na expressão dos
microRNAs -21, -451 e -29c e da proteína FKBP52**

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. Paulo Cesar Serafini

SÃO PAULO

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Miyadahira, Eduardo Hideki

Efeito da remoção cirúrgica das lesões de endometriose profunda na expressão dos microRNAs -21, -451 e -29c e da proteína FKBP52 / Eduardo Hideki Miyadahira. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientador: Paulo Cesar Serafini.

Descritores: 1.Endometriose 2.MicroRNAs 3.Proteínas de ligação a tacrolimo 4.Infertilidade

USP/FM/DBD-159/16

Dedicatória

Aos meus pais, **Ana e Seizo**,
Pelo amor e carinho incondicionais.
Pela vida e educação que nos proporcionaram.
Pelo exemplo e suporte na vida acadêmica.
Não pouparam esforços para nos fornecer o melhor.

À minha irmã, **Mariana**,
Pela companhia de estrada e
Pela cumplicidade de todos os momentos.
Nas perdas e nas conquistas.

À minha esposa, **Juliana**,
Meu eterno amor!
Meu brinde à vida de todas as manhãs e
Meu aconchego de todas as noites!
Pelo jeito simples de trazer felicidade!
Pelo incentivo e suporte na confecção desta dissertação.

Por fim, mas representando um começo,
Ao nosso querido filho, **Eric**.
Sua chegada nos trouxe a reflexão sobre
Nossas origens e nosso legado.
Este sentimento indescritível da paternidade,
Remonta àqueles que nos criaram,
Exaltando a ciclicidade da vida!
Dando vida ao amor ou
Amor à vida!

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Edmund Chada Baracat**, digníssimo Prof. Titular da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Por permitir que mantivesse minha atividade acadêmica, primeiramente, na Preceptoria da Disciplina e, posteriormente, no Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas.

Pelo exemplo de comando e incentivo ao estado da arte em pesquisa.

Ao Prof. **Dr. Paulo Cesar Serafini**, pela orientação desta dissertação.

Pelos ensinamentos que apenas os mestres nos trazem.

Pelo exemplo de dedicação ao trabalho, cuidado aos pacientes e incansável incentivo às pesquisas.

Pelas sábias palavras e orientações, não apenas acadêmicas, mas de vida.

Aos meus queridos sogros, **Elizabette e Fernando**, pelo exemplo de educação às filhas e a mim. Pelo apoio em diversas fases do nosso convívio.

Aos meus queridos cunhados, **Danielle, Lilian, Bruno e Lucas**, pelo suporte a esta etapa importante da minha vida.

Ao **Prof. Asgerally T. Fazleabas**, diretor e chefe do Departamento de Obstetrícia, Ginecologia e Medicina Reprodutiva da *Michigan State University*, por permitir minha estadia e análise de amostras no laboratório sob sua responsabilidade. Pelo incentivo e suporte desta pesquisa.

Ao **Dr. Niraj R. Joshi**, pesquisador associado do Departamento de Obstetrícia, Ginecologia e Medicina Reprodutiva da *Michigan State University*, pela ajuda irrestrita durante toda a passagem por *Grand Rapids* e pelos ensinamentos e treinamento das técnicas de biologia molecular.

Ao **Dr. Eduardo Leme Alves da Motta**, por permitir meu ingresso no grupo Huntington Medicina Reprodutiva e pelos valiosos ensinamentos na área.

À **Dra. Luciana Pardini Chamié**, pela realização das ultrassonografias. Exemplo de profissional e de pessoa.

Aos **Drs. Duarte Miguel Rodrigues Ribeiro e Ricardo Mendes Alves Pereira**, pela maestria, minúcia e destreza no tratamento cirúrgico das pacientes.

À **Dra. Tatiana Bonetti**, pela ajuda com as análises estatísticas e correções no exame de qualificação dessa dissertação.

Ao **Prof. Dr. José Maria Soares Junior** e ao **Prof. Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel**, pelas sugestões auferidas no exame de qualificação dessa dissertação.

À minha querida tia e madrinha, **Mitsuko**, pelas correções gramaticais e ortográficas.

À Sra. **Lucinda Cristina Pereira**, pelas orientações e ajuda nos processos requisitados pela Pós-Graduação do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia para confecção dessa dissertação.

A todos os **docentes e assistentes da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia**, pela minha formação como ginecologista e pelo excelente convívio.

A todas as **pacientes e seus companheiros e famílias**, motivo maior da incessante vontade de aprender e melhorar.

NORMALIZAÇÃO 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 Siglas, Símbolos e Abreviações

Lista de Figuras, Quadros e Gráficos

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Endometriose	2
1.2 Endometriose e proteína FKBP52	5
1.3 MiRNA	6
1.3.1 MiRNAs e doenças ginecológicas	8
1.4 Endometriose e miRNA	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Geral	18
2.2 Específicos	18
3 MÉTODOS	19
3.1 Ética em pesquisa	20
3.2 Casuística	21
3.2.1 Critérios de inclusão	21
3.2.2 Critérios de não inclusão	22
3.2.3 Constituição dos grupos de estudo	22
3.3 Ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal	23
3.4 Tratamento cirúrgico	23
3.5 Obtenção de amostras de tecido	24
3.5.1 Grupo de estudo	24
3.5.2 Grupo controle	25
3.6 Extração de RNA	25
3.7 Análise pelo RT-qPCR	25
3.8 Análise Estatística	26

4 RESULTADOS	27
4.1 Análise de miRNAs	31
4.1.1 MiRNA-21	31
4.1.2 MiRNA-451	33
4.1.3 MiRNA-29c	34
4.2 Análise da proteína FKBP52	36
5 DISCUSSÃO	39
5.1 Conduta cirúrgica na endometriose	40
5.2 Diagnóstico ultrassonográfico da endometriose	40
5.3 MiRNAs e fase do ciclo menstrual	41
5.4 MiRNA-21	43
5.5 MiRNA-451	44
5.6 MiRNA-29c	45
5.7 FKBP52	46
6 CONCLUSÕES	49
7 ANEXOS	51
Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo	52
Anexo B - Termo de consentimento livre e esclarecido do grupo de estudo	54
Anexo C - Termo de consentimento livre e esclarecido do grupo controle	59
Anexo D - Ilustração auxiliar ao laudo da ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal	64
Anexo E - Inventário pélvico cirúrgico (relacionado ao caso do Anexo C)	65
Anexo F - Aspecto pós-cirúrgico (relacionado ao caso do Anexo C)	66
8 REFERÊNCIAS	67

Listas

SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIações

cDNA	DNA complementar
C\$	Dólar canadense
DNA	Ácido desoxirribonucleico
€	Euro
FIV	Fertilização in vitro
IMC	Índice de Massa Corporal
Kg/m ²	kilogramas/metro ²
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
ng	nanograma
pre-miRNA	microRNA-precursor
pri-miRNA	microRNA-primário
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
R\$	Reais
RISC	Complexo de inativação induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
siRNA	RNA interferente pequeno
snRNA	RNA nuclear pequeno
µL	Microlitro

FIGURAS, QUADROS E GRÁFICOS

Figura 1 -	Biogênese dos miRNAs.....	8
Figura 2 -	MiRNAs envolvidos na patogênese da endometriose	15
Figura 3 -	Sítio de ligação miRNA-29c e FKBP52.....	47
Quadro 1 -	Estudos de miRNA no câncer de endométrio.....	10
Quadro 2 -	Estudos de miRNA no câncer de colo do útero	11
Quadro 3 -	Estudos de miRNA no câncer de ovário	12
Gráfico 1 -	Expressão do miRNA-21 - São Paulo, SP- 2012 a 2014.....	31
Gráfico 2 -	Expressão do miRNA-451 - São Paulo, SP- 2012 a 2014.....	33
Gráfico 3 -	Expressão do miRNA-29c - São Paulo, SP- 2012 a 2014	35
Gráfico 4 -	Expressão da proteína FKBP52 - São Paulo, SP- 2012 a 2014.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características dos grupos de estudo e controle - São Paulo, SP- 2012 a 2014	28
Tabela 2 -	Estadiamento cirúrgico da endometriose segundo a <i>American Fertility Society</i> - São Paulo, SP- 2012 a 2014	29
Tabela 3 -	Caracterização das amostras teciduais analisadas segundo a fase do ciclo menstrual - São Paulo, SP- 2012 a 2014.....	30
Tabela 4 -	Relação da expressão de miRNA-21 nas amostras e comparação com o grupo controle - São Paulo, SP- 2012 a 2014	32
Tabela 5 -	Comparação da expressão do miRNA-21 entre as amostras do grupo de estudo - São Paulo, SP- 2012 a 2014	32
Tabela 6 -	Relação da expressão de miRNA-451 nas amostras e comparação com o grupo controle - São Paulo, SP- 2012 a 2014	33
Tabela 7 -	Comparação da expressão do miRNA-451 entre as amostras do grupo de estudo - São Paulo, SP- 2012 a 2014	34
Tabela 8 -	Relação da expressão de miRNA-29c nas amostras e comparação com o grupo controle - São Paulo, SP- 2012 a 2014	35

Tabela 9 - Comparação da expressão do miRNA-29c entre as amostras do grupo de estudo - São Paulo, SP- 2012 a 2014	36
Tabela 10 - Relação da expressão da FKBP52 nas amostras e comparação com o grupo controle - São Paulo, SP- 2012 a 2014	37
Tabela 11 - Comparação da expressão da FKBP52 entre as amostras do grupo de estudo - São Paulo, SP- 2012 a 2014.....	38

Resumo

Miyadahira EH. *Efeito da remoção cirúrgica das lesões de endometriose profunda na expressão dos microRNAs -21, -451 e -29c e da proteína FKBP52* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: O tratamento cirúrgico da endometriose profunda tem se mostrado benéfico para os resultados de Reprodução Assistida. O motivo que leva aos melhores resultados ainda é desconhecido, mas remete à etiologia multifatorial dessa doença. Observa-se, então, a oportunidade de investigar mecanismos moleculares que possam justificar este fato. Nesse contexto, os microRNAs podem desempenhar papel fundamental na medida em que alteram a expressão de diferentes genes por meio da inibição pós-transcricional. **OBJETIVO:** Analisar o efeito da remoção cirúrgica das lesões de endometriose profunda na expressão dos microRNAs -21, -451 e -29c, além da expressão da proteína FKBP52. **MÉTODOS:** Trata-se de estudo clínico, prospectivo, longitudinal e comparativo no qual foram incluídas 26 pacientes que foram divididas em dois grupos, segundo o resultado da ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal. As pacientes que não apresentaram alterações sugestivas de endometriose compuseram o grupo controle (n = 11) e foram submetidas à coleta de amostra de endométrio. As pacientes do grupo de estudo (n = 15) foram submetidas à amostragem endometrial antes e após o tratamento cirúrgico da endometriose, além de ter sido realizada a coleta de amostra da lesão profunda durante o ato operatório. Foi realizada a extração total de RNA dessas amostras e, posteriormente, PCR em tempo real para análise de expressão dos microRNAs -21, -451 e -29c, além da proteína FKBP52. **RESULTADOS:** A comparação da expressão relativa dos microRNAs -21 e -451 entre as amostras, de forma geral, não mostrou diferença estatisticamente significativa. A expressão relativa do microRNA-29c foi maior no endométrio de pacientes com endometriose em relação ao grupo controle e ainda maior nas lesões de endometriose profunda. Após a cirurgia, a expressão do microRNA-29c no endométrio, foi equivalente à do grupo controle. A expressão da FKBP52 foi menor no endométrio das mulheres com endometriose e nas lesões da doença em comparação ao grupo controle. Após o tratamento cirúrgico houve aumento da expressão de FKBP52 nas amostras de endométrio nas pacientes com endometriose que passou a ser semelhante à do grupo controle. **CONCLUSÕES:** Os resultados sugerem que a presença das lesões de endometriose pode aumentar a expressão do microRNA-29c no endométrio e, por conseguinte, diminuir a expressão de um dos seus RNA mensageiros alvos que codifica a proteína FKBP52. Após o tratamento cirúrgico, com remoção das lesões de endometriose, a expressão do microRNA-29c e da FKBP52 se assemelhou à do grupo controle.

Descritores: endometriose; microRNA; proteínas de ligação a tacrolimo; infertilidade.

Abstract

Miyadahira EH. *The effect of surgical removal of deeply infiltrating endometriosis (DIE) on the microRNAs -21, -451, -29c and the protein FKBP52*. [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

INTRODUCTION: Surgical treatment of deeply infiltrating endometriosis appears to yield benefits to the affected women and also to the assisted reproduction treatments. Although the mechanisms involved on the improvement of the outcomes are still unknown; yet, they are similar to the multifactorial origin of the endometriosis. Considering that the microRNAs can modify different genes expression, it was investigated their role concerning the molecular pathways leading to endometriosis and the clinical betterment of the assisted reproductive procedures after the surgical treatment. **OBJECTIVE:** The aim of this study was to evaluate the effect of surgical treatment in women with endometriosis focusing the microRNAs -21, -451 and -29c expression, as well as the protein FKBP52 expression. **METHODS:** This is a clinical, prospective, longitudinal and comparative study which included 26 patients that were divided into two groups according to the findings of the transvaginal ultrasound with bowel preparation. Eleven women without evidence of DIE composed the control group and were submitted to eutopic endometrium sampling. Fifteen women presented with evidence for DIE detected by pelvic ultrasound were also submitted to eutopic endometrium sampling before and after surgical treatment. Surgical procedures revealed the presence of relevant DIE. Total RNA extraction of all samples was performed and followed by real time PCR to evaluate microRNAs -21, -451, -29c and protein FKBP52 expression. **RESULTS:** MicroRNAs -21 and -451 expression analysis did not show statistically significant difference among samples. Nonetheless, expression of microRNA-29c was elevated in eutopic endometrium of women suffering from DIE in comparison to the control group. After surgery, the microRNA-29c expression in eutopic endometrium became equivalent to the control group. The expression for FKBP52 was lower in women having DIE than those without endometriosis. The surgical treatment increased the expression of the protein FKBP52 in eutopic endometrial samples, turning it similar to the control group. **CONCLUSIONS:** The results of this study suggest that the presence of DIE might increase the expression of microRNA-29c in eutopic endometrium and consequently decrease the expression of one of its target messenger RNA that codifies the protein FKBP52. After surgical removal of endometriosis lesions, the microRNA-29c and the FKBP52 expression returned to a level similar to the control group.

Descriptors: endometriosis; microRNA; tacrolimus binding proteins; infertility.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A mudança no papel social da mulher, sobretudo após a introdução dos anticoncepcionais hormonais e outras tecnologias para o controle da natalidade, trouxe desafios ao consultório do ginecologista. O controle e a autonomia sobre o planejamento familiar possibilitaram às mulheres assumirem papel de igualdade em relação ao seu parceiro. Dessa forma, elas passaram a ocupar novos espaços sociais, políticos e econômicos. Como resultado dessas transformações, a programação gestacional passou a ocorrer após a consolidação das prioridades socioeconômicas femininas, em idades menos favoráveis. Isso acrescentou a essas mulheres uma série de inconvenientes, como maiores taxas de morbimortalidade materno-fetal^{1,2} e elevação da incidência de câncer de mama³. Consequentemente, a endometriose vem ganhando posição de destaque no cotidiano do ginecologista.

1.1 Endometriose

A endometriose é definida como a presença ectópica de células endometriais glandulares e estromais em diferentes compartimentos, geralmente na cavidade pélvica⁴. Tal definição demanda, portanto, uma avaliação anatomopatológica para confirmação diagnóstica. Considerada padrão ouro, a laparoscopia com visualização direta da lesão permite, via de regra, a obtenção dessa amostra tecidual. Na medida que o diagnóstico é concluído de forma invasiva, muitas vezes, a suspeição diagnóstica é baseada na história clínica (dismenorreia, dor pélvica acíclica e infertilidade) e nos exames de imagem (ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal ou ressonância nuclear magnética). Assim, o cálculo de incidência e de prevalência é prejudicado pela não uniformização da obtenção de dados epidemiológicos. No entanto, estima-se que a prevalência dessa

doença seja de, aproximadamente, 10% na população em geral de mulheres em idade reprodutiva, atingindo 50 - 60% nas mulheres inférteis^{5,6}.

O impacto da doença extrapola o âmbito dos consultórios, pois traz prejuízos para a qualidade de vida da paciente, refletindo também na família e na sociedade. Um estudo conduzido em 12 centros médicos de 10 países com objetivo de analisar custos e impacto na qualidade de vida mostra uma média de 6,4 anos de sintomas até o diagnóstico de endometriose e um prejuízo de 19% na qualidade de vida, em comparação com pessoas em situação ideal de saúde. Além disso, mostra custo anual médio de 33.526 reais (R\$) ou 9.579 Euros (€) por pessoa, sendo R\$ 10.895 (€ 3.113) de gastos diretos (cirurgia, hospitalização, exames, honorários médicos, etc.) e R\$ 22.043 (€ 6.298) de gastos indiretos (perda de produtividade). Compara, ainda, os gastos diretos com outras doenças crônicas que apresentam custos semelhantes em países europeus, como diabetes melito (R\$ 10.003), doença de Crohn (R\$ 10.885 - 26.064) e artrite reumatoide (R\$ 14.994)⁷. Nnoaham et al. calcularam que cada mulher com endometriose perde 10,8 horas de trabalho por semana⁸.

No Canadá, estima-se custo de R\$ 12.740 ou 5.200 dólares canadenses (C\$) por ano, por paciente, com diagnóstico confirmado de endometriose, sendo 78% devido à perda de produtividade e à perda de tempo de lazer. O custo anual para a sociedade canadense seria de R\$ 4,41 bilhões (C\$ 1,8 bilhões)⁹. No Brasil, infelizmente, faltam estudos que estimam os custos com a endometriose¹⁰.

A etiologia e a fisiopatologia da endometriose ainda não estão totalmente elucidadas. Acredita-se que a endometriose seja uma doença multifatorial e que algumas teorias formuladas podem explicar a presença e o desenvolvimento ectópico do tecido endometrial.

A teoria da menstruação retrógrada tem melhores evidências e, por isso, é a mais aceita. Atribui-se a Sampson, em 1927, a primeira menção dessa hipótese, em estudo que preconizava a disseminação venosa e linfática do tecido endometrial¹¹. As evidências foram sustentando tal

hipótese¹² e até modelos animais de endometriose foram criados com base nessa teoria¹³.

A teoria imunológica e a das células tronco podem ser desdobramentos da primeira. Acredita-se que as pacientes com endometriose tenham alterações na resposta imune o que favoreceria a perpetuação das células endometriais que atingiram a cavidade pélvica pela menstruação retrógrada¹⁴. Pela mesma via, células progenitoras do epitélio endometrial e células tronco mesenquimais originariam implantes ectópicos¹⁵.

Além disso, a teoria da metaplasia celômica, originalmente proposta por Ferguson, em 1969¹⁶, ainda pode ser aventada principalmente para explicar a gênese dos endometriomas¹⁵ e, de igual modo, a teoria dos remanescentes dos ductos Müllerianos, para explicar as lesões no fundo de saco vaginal e ligamentos útero-sacros¹⁵.

É clara a relação entre endometriose e infertilidade. Sabe-se que a taxa de fecundidade dos casais cujas mulheres têm endometriose não tratada é de, aproximadamente, 2 a 10%, enquanto daqueles, sem problemas de fertilidade essa taxa é de 15 a 20%¹⁷. Após seguimento de 3 anos de mulheres submetidas à videolaparoscopia por infertilidade, aquelas com endometriose tiveram menor chance de gravidez em relação às com infertilidade sem causa aparente, 36% e 55%, respectivamente¹⁸.

Alguns mecanismos explicam a infertilidade relacionada à endometriose. A exacerbação de células inflamatórias e de citocinas pode afetar a função tubária e a sincronia das contrações miométriais, prejudicando o transporte dos gametas e do embrião. Alterações na ovulação e na produção oocitária, igualmente, são creditadas à inflamação associada aos endometriomas. Ademais, a receptividade endometrial também pode estar comprometida, não apenas pelo ambiente inflamatório, mas também pela resistência à progesterona^{14,19}.

De fato, apesar de não consensual na literatura, alguns autores demonstram que o tratamento cirúrgico pode beneficiar o tratamento de

reprodução assistida. Em estudo clínico e prospectivo, em 2008, Bianchi et al. demonstraram o benefício da cirurgia laparoscópica para as pacientes com endometriose profunda que se submeteram ao tratamento de fertilização *in vitro* após a laparoscopia. Nesse estudo, foram comparados dois grupos de pacientes: um grupo que optou pela fertilização *in vitro* sem a cirurgia prévia e outro que foi submetido à ressecção laparoscópica dos focos de endometriose profunda e, posteriormente, à fertilização *in vitro*. A chance de gravidez no grupo operado foi 2,45 vezes maior²⁰.

Dessa forma, uma vez que a endometriose se associa a alterações moleculares que dificultam a gestação, questiona-se a possibilidade de reverter tais distúrbios, após o tratamento cirúrgico da endometriose e, por conseguinte, obter melhores resultados nos tratamentos de reprodução assistida¹⁴. Com a intenção de investigar essa hipótese, foram selecionados a proteína FKBP52 e os microRNAs (miRNAs) para analisar as modificações endometriais pós tratamento cirúrgico.

1.2 Endometriose e proteína FKBP52

Descoberta em 1985, a proteína FKBP52 pertence à subclasse das imunofilinas devido a sua característica de poder se ligar ao imunossupressor FK506 (tacrolimus). É composta por quatro regiões que lhe conferem diversas propriedades, dentre elas destaca-se a modulação dos receptores de esteroides por meio de sua interação com a *heat shock protein* 90 kDa (Hsp90). Trata-se de um regulador positivo para o receptor de glicocorticoide, de androgênio e de progesterona, mas não de estrogênio e de mineralocorticoide. Essa ação é competitiva e antagonizada pela proteína FKBP51 que é um regulador negativo para os receptores de esteroides^{21,22}.

Tranguch et al. estudaram ratos *knock-out* para o gene que codifica a FKBP52 e observaram um fenótipo com função ovulatória normal, mas esses animais eram inférteis devido à alteração na receptividade uterina

conferida pela redução da atividade do receptor de progesterona²³. Em estudo posterior, os mesmos autores mostraram evidências sugerindo que a deficiência da FKBP52 está envolvida na gênese da endometriose em ratos e em humanos, por meio da alteração de moléculas que estimulariam o crescimento das células endometrióticas, aumentariam a inflamação e promoveriam a angiogênese²⁴.

Ainda para corroborar a preservação dessa alteração entre espécies, Jackson *et al.* descreveram a deficiência da FKBP52 no endométrio do modelo de endometriose induzida em babuínos comparando com as amostras de animais do grupo controle²⁵. De forma similar, Yang *et al.* relataram menor expressão dessa proteína no endométrio de mulheres com endometriose em comparação ao endométrio de pacientes sem endometriose²⁶.

A alteração na receptividade uterina pela modificação da expressão da FKBP52 é um mecanismo que pode prejudicar a implantação embrionária nas pacientes com endometriose submetidas à fertilização *in vitro* (FIV) e transferência embrionária.

Dessa forma, pelos motivos expostos, incluiu-se a análise dessa proteína no presente estudo.

1.3 MicroRNA

Em 1993, um grupo de pesquisadores publicaram a primeira descrição dos miRNAs²⁷. Estudando o gene *lin-4* que age no controle do desenvolvimento larval do *Caenorhabditis elegans*, descobriram que esse gene não traduzia uma proteína, mas dois pequenos RNAs de 22 e 61 nucleotídeos. Posteriormente, notou-se que o maior era precursor do menor e esses pequenos RNAs tinham uma complementaridade *antisense* no gene *lin-14*, gene esse que já se sabia ser modulado pelo *lin-4*. Logo após, observou-se que esse controle da expressão do *lin-14* pelo *lin-4* ocorria

reduzindo o nível de proteína traduzido pelo lin-14, sem alterar seus níveis de RNA mensageiro (mRNA)²⁸.

Decorridos sete anos, um segundo gene, let-7, também do nematódeo *C. elegans* foi descrito como transcrito de um RNA com 21 nucleotídeos²⁹. E, em menos de um ano, outros três grupos descreveram mais de 100 genes que transcrevem miRNAs³⁰⁻³².

Até o presente momento, são descritos mais de 1880 sequências de miRNAs nos *Homo sapiens*³³. Estima-se que, aproximadamente, 30% das proteínas codificadas pelo genoma humano (mais de 5.300 genes) podem ser alvos dos miRNAs³⁴. Lim et al., utilizando a ferramenta MirScan, calcularam que aproximadamente 1% dos genes preditos no genoma humano (entre 200 a 255 genes) são possíveis codificadores de miRNAs³⁵.

Diferentemente dos RNAs interferentes pequenos (siRNA), a maioria dos genes que codificam os miRNAs estão localizados em regiões intrônicas do genoma humano. Esses genes são transcritos pela polimerase II, originando os miRNA primários (pri-miRNA). Os pri-miRNA têm o formato de grampo de cabelo e são processados pela enzima Drosha, liberando os miRNA precursores (pre-miRNA) que têm aproximadamente 70 nucleotídeos. Os pre-miRNA são exportados para o citoplasma pela Exportina-5 e processados pela enzima Dicer para formar duplas de miRNA-miRNA* de 21 a 24 nucleotídeos. As helicases quebram essas duplas em fitas únicas de miRNA e a que apresentar o pareamento de bases mais fraco na região 5', junta-se às proteínas Argonautas para formar o complexo de inativação induzido por RNA (RISC)^{36,37}.

O complexo RISC, por sua vez, guiado pela fita única de miRNA liga-se ao mRNA alvo. Após esse processo, o mRNA pode ser degradado ou pode ocorrer a inibição da tradução (mais comum). O grau de homologia entre miRNA e o mRNA alvo parece determinar o mecanismo que será sucedido. Em geral, a complementaridade parcial leva à inibição da tradução, ao passo que, a alta complementaridade leva à degradação do mRNA³⁸ (Figura 1).

Fonte: Teague et al., 2010³⁷.

Figura 1 - Biogênese dos miRNAs

1.3.1 MiRNA e doenças ginecológicas

Algumas características dos miRNAs facilitam o seu estudo, como o fato de estarem presentes em diversos tecidos e fluidos corporais e a necessidade de pouca amostra de material para sua análise. Além disso, a possibilidade de modular diversas expressões gênicas confere aos miRNAs potencial objeto de investigações vinculadas não somente a etiopatogenia,

mas também como biomarcadores ou ainda alvos terapêuticos ou de seguimento terapêutico de algumas doenças.

Os miRNAs foram estudados em algumas doenças benignas e malignas ginecológicas, por exemplo: leiomioma, endometriose, abortamento de repetição, câncer do endométrio, do colo uterino, do ovário e das mamas. Grande parte dessas pesquisas descreve perfis de miRNAs que apresentam maior ou menor expressão em alguma situação patológica comparada a um grupo controle. Em estudo de revisão, Gilabert-Estelles et al. agruparam em quadros os principais estudos de algumas doenças ginecológicas e os miRNAs envolvidos³⁹.

Quadro 1 - Estudos de miRNA no câncer de endométrio

miRNA com regulação para cima	miRNA com regulação para baixo	Grupos	Associação	Métodos	Referência
Let-7c, miR-103, -106a, -107, -181a, -185, -210, -423	let 7i, miR-30c, -152, -193, -221	CEE vs HA vs endométrio normal		microsérie RT-qPCR	Boren 2008
miR-10a, -17-5p, -23a*, -25, -28, -34a, -95, -103, -106a, -107, -130b, -141, -151, -155, -182, -183, -184, -191, -194, -200a/c, -203, -205, -210, -215, -223, -301, -325, -326, -330 miR-10a,		CEE vs endométrio normal		microsérie RT-qPCR	Chung 2009
miR-10a, -31, -96, -141, -142-5p, -155, -182, -200a/b/c, -203, -205, -210, -363, -429, -432, -449	miR-99b, -133b, -193a, -193b, -204, -368	CEE vs endométrio adjacente		microsérie	Wu W 2009
miR-9, -19b, -146, -181c, -183, -200c, -205, -223, -423, -425	let-7a, miR-32, -33b, -369, -409, -424, -431, -451, -496, -503, -516	CEE (estádio I) vs endométrio normal	↑ miR-199c vs ↑ sobrevida	microsérie RT-qPCR	Cohn 2010
miR-34a, -182, -183, -200a, -205, -572, -622, -650	miR-411, 487b	CEE vs endométrio normal		microsérie RT-qPCR	Ratner 2010
miR-7, -10a/a*, -17, -18a/b, -23a*, -30c2*, -31, -33b*, -95, -96, -106a, -125a-3p, -134, -135a*/b, -150*, -182, -183, -188-5p, -193a-5p, -198, -200a/a*/b/b*/c, -202, -203, -205, -210, -223, -224, -330-3p, -371-5p, -425, -429, -483-5p, -494, -501-5p, -505*, -513a-5p, -513b, -518c*, -557, -564, -575, -601, -622, -623, -629*, -630, -652, -663, -760, -765, -768-5p, -801, -877, -892b, -923, -939, -1224-5p, -1225-5p, -1226*	miR-1, -10b*, -23b, -24-1*, -27b, -29b, -33a, -34b/b*, -34c-5p, -101, -127-3p, -132*, -133a/b, -136/136*, -139-5p, -140-3p/5p, -142-3p/5p, -143/143*, -145/145*, -152, -195, -196b, -199a-5p, -199b-3p/5p, -214/214*, -299-3p/5p, -337-5p, -376a/c, -377, -379, -381, -410, -411, -424, -450a, -455-3p/5p, -497, -503, -542-3p, -542-5p, -654-3p, -873	CES vs endométrio normal	↓ miR-152 & miR-101 vs prognóstico reservado	microsérie RT-qPCR	Hiroki 2010
miR-15b, -135a/b, -141, -142-5p/3p, -200a/b/c, -203, -205, -210, -429, -519a, -888	miR-1, -125b-2, -129-3p, -133a/b, -137, -504	CEE vs endométrio normal CES vs endométrio normal		TLDA RT-qPCR	Devor 2011
miR-9/-9*, -18a, -96, -141, -146a, -200a/b/b*/c, -203, -205, -210, -421, -429, -516a-5p, -605, -614, -936	miR-10b*, 23a*, -100, -127-3p, -152, -199b-3p, -199b-5p, -370, -376a/c, -381, -410, -424, -424*, -431, -432, -503, -542-3p/5p, -596, -610, -630, -632, -760	CEE vs HA vs endométrio normal		microsérie RT-qPCR	Snowdon 2011

CEE: carcinoma endometrial endometrióide; CES: carcinoma endometrial seroso; HA: hiperplasia atípica; TLDA: *Taqman Low Density Array*; RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real; miR: miRNA

Fonte: Gilabert-Estelles et al., 2012³⁹

Quadro 2 - Estudos de miRNA no câncer de colo do útero

miRNA com regulação para cima	miRNA com regulação para baixo	Grupos	Associação	Métodos	Referência
miR-21	miR-143 miR-126,-143,	6 amostras de câncer cervical vs 5 amostras normais 29 amostras pareadas de cancer cervical e amostras normais		Sequência e análise Northern	Lui 2007
miR-15b, 16, -146a, -155, -223	miR-126,-143, -145, -218, -424	Tecido de câncer cervical vs amostra normal		microsérie análise Northernblot	Wang 2008
miR-193b, -200c	miR-143, -145, -218, -497	Linhagens celulares de câncer cervical vs amostra normal		microsérie análise Northernblot RT-qPCR	Martinez 2008
miR-9, -127, 133a/b, -199a/a*, -199b,-214	miR-149, -203	10 amostras de câncer cervical e 10 amostras cervicais normais	miR-127 marcador para metástase linfática e miR-199a um potencial alvo terapêutico	RT-qPCR	Lee 2008
miR-10a, -148a, -196a	miR-29a, -143, -145, -199a, -203	19 amostras cervicais normais vs 4 carcinomas de células escamosas, 5 lesões intraepiteliais de alto grau e 9 de baixo grau		microsérie	Pereira 2010
		102 amostras de câncer cervical	miR-200a e miR-9 com sobrevida ao câncer	RT-qPCR	Hu 2010
miR-10a*, -30a*, -610, -886-5p	miR-302d, -346, -518b	12 pares de tumor cervical vs tecido são adjacente	miR-886-5p inibe apoptose por regular para baixo a expressão de Bax	microsérie	Li 2011

RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real; miR: miRNA

Fonte: Gilabert-Estelles et al., 2012³⁹

Quadro 3 - Estudos de miRNA no câncer de ovário

miRNA com regulação para cima	miRNA com regulação para baixo	Grupos	Associação	Métodos	Referência
miR-200 family (miR-200a/b/c, -141, -429), miR-21, -203, -205	miR-199a, -140, -145, -125b1	Câncer vs tecido ovariano normal		microsérie RT-qPCR	Iorio 2007
	let-7 family, miR-125a/b	Câncer vs tecido ovariano normal			Spizzo 2009
miR-200a/b/c, -141, -16, -21, -93	let-7b, miR-99a, -100, -125b, -145, -214	Câncer vs tecido ovariano normal		microsérie RT-qPCR	Nam 2008
let-7f, miR-23a, -182, -200, -210, -222	miR-145, -214	Metástase vs tumor primário		microsérie RT-qPCR	Vaksman 2011
		Amostras de câncer ovariano avançado	miR-410, 645 negativamente associado com sobrevida	microsérie RT-qPCR	Shih 2011
		Amostra de câncer ovariano	27 miRNAs e resposta à quimioterapia	microsérie RT-qPCR	Boren 2009
		Amostra de câncer ovariano	miR-214 regulado para baixo em tumores resistentes à platina	microsérie RT-qPCR	Yang H 2008
		Amostra de câncer ovariano	família miR-200 e resultado clínico (controverso)	microsérie RT-qPCR	Shih, Nam, Hu, Eitan
miR-21, -141, -200a/b/c, -203, -214		Exossomos (câncer vs doença benigna)		microsérie	Taylor 2008
miR-21, -29a, -92, -93, -126	miR-99b, -127, -155	Soro		TLDA RT-qPCR	Resnick 2009
miR-30c1*	miR-181a*, -342-3p, -450b-5p	Sangue		microsérie	Häusler 2010

RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real; TLDA: *Taqman Low Density Array*; miR: miRNA

Fonte: Gilabert-Estelles et al., 2012³⁹

A análise dos quadros revela o perfil dos estudos que associam os miRNAs com alguns cânceres ginecológicos. Observa-se que são pesquisas com menos de 10 anos, em sua maioria, descrevendo perfis de miRNAs diferentemente expressos na doença em estudo. Ressalta-se, ainda, que os grupos de comparação não são homogêneos, fato que pode enviesar a comparação entre eles. No entanto, demonstra-se a complexidade de interações e vias moleculares envolvidas, bem como o potencial de utilização para o diagnóstico, prognóstico, tratamento e seguimento das doenças.

A descrição do perfil de alteração de miRNAs em determinada doença pode servir como biomarcador e, assim, propiciar um diagnóstico precoce e/ou menos invasivo dessas enfermidades. Por exemplo, para o câncer de ovário que é uma doença oligossintomática e cujo diagnóstico em muitos casos é feito somente em estádios avançados, a detecção precoce pode mudar o prognóstico do tratamento. Nesse sentido, Resnick et al., comparando amostras do soro de pacientes com câncer de ovário com controles saudáveis, demonstraram cinco miRNAs com expressão para cima (-21, -92, -93, -126 e -29a) e três com expressão para baixo (-155, -127 e -99b). Destacaram os miRNAs -21, -92 e -93 que já eram descritos como oncomirs e podem ser candidatos a biomarcadores dessa doença⁴⁰. Häusler et al. submeteram o sangue total de pacientes com câncer de ovário e controles saudáveis à análise de microsséries, tendo identificado 147 miRNAs com expressão alterada. Após análise de bioinformática e cálculos estatísticos, avaliaram a eficácia de detecção da doença por meio do perfil de miRNAs e concluíram que não há sensibilidade e especificidade suficiente para ser aplicada na população. No entanto, destacaram que os cânceres produzem perfis de miRNAs característicos no sangue e, sendo assim, podem ser utilizados para melhorar a detecção do câncer de ovário⁴¹.

A utilização dos miRNAs como alvos de terapia de doenças ainda é recente e predominantemente em experimentos com animais⁴². No entanto, destaca-se um estudo clínico de fase 2 que demonstrou a eficácia de uma

medicação que antagoniza o miRNA-122 para controle do vírus da hepatite C em portadores crônicos da doença⁴³.

1.4 Endometriose e miRNA

A pluralidade funcional de cada miRNA nos diversos processos celulares confronta-se à idéia da etiologia multifatorial da endometriose. Dessa forma, questiona-se a atuação dos miRNAs na endometriose. Os resultados do estudo *in silico* de Wren et al., em 2007, sugerem que alguns genes potencialmente envolvidos na fisiopatologia da endometriose eram regulados após a transcrição⁴⁴.

O primeiro trabalho a relacionar os miRNAs com a endometriose foi publicado, em 2007, por Pan et al.⁴⁵. Nesse estudo, foram comparadas amostras endometriais de pacientes com e sem endometriose e, utilizando microsséries, observaram 48 miRNAs diferentemente expressos nessa doença. Confirmaram ainda essa diferença de expressão pela PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real de sete miRNAs selecionados, além de demonstrarem que os esteroides ovarianos podem influenciar na expressão de alguns miRNAs.

A partir de então, outros estudos acrescentaram outros miRNAs que podem estar envolvidos na fisiopatologia da endometriose. Teague et al., 2010³⁷, propuseram alguns miRNAs candidatos a contribuir para os diversos mecanismos que levam à endometriose (Figura 2).

Fonte: Teague et al., 2010³⁷.

Figura 2 - MiRNAs envolvidos na patogênese da endometriose

Em estudo utilizando o modelo de endometriose em babuínos, realizaram-se microsséries em amostras endometriais de animais com endometriose e sem endometriose. Foram encontrados 8 miRNAs diferentemente expressos dentre esses grupos, a saber: hsa-miR-451, hsa-miR-181a, hsa-miR-200a, hsa-miR-19b, hsa-miR-424, hsa-miR-21, hsa-miR-29c e hsa-miR-141⁴⁶. Os miRNAs -21, -29c e -451 apresentaram maior diferença de expressão e foram selecionados para as análises do presente estudo.

Diante das observações clínicas que sugerem benefícios do tratamento cirúrgico da endometriose, antecedendo a reprodução assistida e os conhecimentos moleculares envolvidos, poder-se-ia formular a hipótese de que, na endometriose, existam miRNAs que alteram a síntese de proteínas essenciais ao preparo endometrial para o sucesso da implantação embrionária.

Portanto, considerando-se que essa hipótese seja uma questão a ser testada, o objetivo da presente pesquisa é investigar o papel da remoção do tecido ectópico de endometriose na expressão dos miRNAs -21, -451 e -29c e da proteína FKBP52.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Analisar o efeito da remoção cirúrgica das lesões de endometriose na expressão dos miRNAs -21, -451 e -29c e da proteína FKBP52 no endométrio de pacientes com endometriose.

2.2 Específicos

- a) Avaliar a expressão do miRNA-21 nas amostras obtidas: endométrio pré-operatório, endométrio pós-operatório e lesão de endometriose e compará-las entre si e com amostra endometrial de mulheres sem endometriose;
- b) Avaliar a expressão do miRNA-451 nas amostras obtidas: endométrio pré-operatório, endométrio pós-operatório e lesão de endometriose e compará-las entre si e com amostra endometrial de mulheres sem endometriose;
- c) Avaliar a expressão do miRNA-29c nas amostras obtidas: endométrio pré-operatório, endométrio pós-operatório e lesão de endometriose e compará-las entre si e com amostra endometrial de mulheres sem endometriose;
- d) Avaliar a expressão da proteína FKBP52 nas amostras obtidas: endométrio pré-operatório, endométrio pós-operatório e lesão de endometriose e compará-las entre si e com amostra endometrial de mulheres sem endometriose.

3 Métodos

3 MÉTODOS

Esta pesquisa clínica, prospectiva, longitudinal e comparativa foi realizada no período de fevereiro de 2012 a fevereiro de 2014, com pacientes portadoras de endometriose e submetidas à cirurgia laparoscópica, fruto da parceria entre a Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a Huntington Medicina Reprodutiva e o Departamento de Obstetrícia, Ginecologia e Medicina Reprodutiva da *Michigan State University*. Trata-se de um estudo de pesquisa molecular, que analisou fragmentos de endométrio ectópico e tópico.

A análise laboratorial de expressão dos miRNA e da expressão da proteína FKBP52 foi realizada na *Michigan State University* no *Van Andel Institute*, laboratório coordenado pelo Prof. Asgerally T. Fazleabas.

3.1 Ética em Pesquisa

O presente estudo foi desenvolvido segundo o projeto de pesquisa que foi elaborado obedecendo todas as orientações contidas na Resolução 466 do Conselho Nacional de Saúde⁴⁷ e recebeu aprovação dos seguintes comitês:

- Comitê de Ética e Conselho de Departamento do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo A)

Todos os sujeitos envolvidos receberam e consentiram em participar no estudo por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos B e C).

3.2 Casuística

A presente casuística é constituída por pacientes que procuraram a Huntington Medicina Reprodutiva para aconselhamento e tratamento de infertilidade. Nesse serviço, o atendimento incluiu propedêutica clínica e exames subsidiários completos e adequados às queixas para a condução do tratamento dessas pacientes.

O enfoque do estudo foi direcionado às mulheres com suspeita clínica e diagnóstico ultrassonográfico de endometriose. Nos casos selecionados, essas pacientes foram submetidas à cirurgia laparoscópica para a exérese das lesões endometrióticas com o intuito de propiciar otimização das taxas de gestação da FIV²⁰. Dessa maneira, as pacientes com endometriose e com a proposta cirúrgica de tratamento, antecedendo a FIV, foram convidadas a participar do estudo. Para o grupo controle foram convidadas as pacientes que não apresentavam endometriose.

3.2.1 Critérios de inclusão

Foram considerados os seguintes critérios de inclusão:

- 1) Idade entre 18 e 44 anos;
- 2) Índice de massa corporal (IMC) menor que 30 Kg/m² (calculado de acordo com a seguinte fórmula: peso (kg)/altura x altura (m²));
- 3) Presença de ambos ovários;
- 4) Não apresentar doença sistêmica clinicamente significativa, como diabetes melito, hipertensão arterial, cardiopatia, doenças autoimunes, entre outras;
- 5) Ter aceito e assinado voluntariamente o termo de consentimento livre e esclarecido.

- 6) Para o grupo de estudo: apresentar diagnóstico de endometriose profunda realizado pela ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal;
- 7) Para o grupo controle: apresentar ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal negativo para endometriose.

3.2.2 Critérios de não inclusão

Os critérios de não inclusão foram:

- 1) Estar reconhecidamente infectada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatite C ou hepatite B;
- 2) Apresentar sangramento ginecológico anormal, não diagnosticado na seleção;
- 3) Ciência de abuso de qualquer substância ou uso de hormônios, além dos sugeridos pelo médico, no período do tratamento;
- 4) Revogação do termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2.3 Constituição dos grupos de estudo

Grupo de estudo

O grupo de estudo foi constituído por 15 pacientes que apresentaram alterações à ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal, sugestivas de endometriose profunda. Essas mulheres foram submetidas à cirurgia laparoscópica com exérese extensa das lesões endometrióticas para aumentar a probabilidade de sucesso na FIV.

Grupo controle

As pacientes que não apresentaram alterações ultrassonográficas sugestivas de endometriose foram convidadas a participar e compor o grupo controle (11 pacientes).

3.3 Ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal

Considerando a alta prevalência da endometriose na população de mulheres inférteis, a ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal tem papel fundamental na propedêutica armada. Não apenas possibilita a descrição minuciosa das lesões, mas também auxilia o planejamento cirúrgico do tratamento^{48,49} (Anexo D e E).

Neste estudo, todas as pacientes realizaram esse exame com um único examinador e seguindo protocolo estabelecido⁵⁰.

3.4 Tratamento cirúrgico

Após avaliação pré-cirúrgica completa, todas as pacientes do grupo de estudo foram submetidas à videolaparoscopia para ressecção dos focos de endometriose. Vale ressaltar que todos os procedimentos foram realizados por dois cirurgiões experientes, utilizando técnicas semelhantes e com táticas praticamente idênticas⁵¹ (Anexo F).

Destacam-se algumas premissas que norteiam o sucesso da cirurgia^{52,53}:

- Jejum de pelo menos 8 horas;
- Preparo intestinal prévio ao procedimento;
- Profilaxia infecciosa e antitrombótica;
- Ressecção ampla de todas as lesões superficiais e profundas;

- Preservação da inervação pélvica, principalmente, nos casos em que as lesões intestinais encontravam-se a 8,0 centímetros ou menos da borda anal;
- Cautela com a introdução da dieta oral pós-cirúrgica.

3.5 Obtenção de amostras de tecido

3.5.1 Grupo de estudo

No grupo de estudo, foram obtidas amostras endometriais após a anestesia e antes do início da cirurgia laparoscópica, bem como amostras de lesões de endometriose profunda durante o procedimento cirúrgico. Posteriormente, aproximadamente 6 meses após a cirurgia, novas amostras endometriais foram adquiridas. As biópsias endometriais foram realizadas com a cânula de Pipelle.

As amostras endometriais e de tecidos obtidas durante a cirurgia foram armazenadas em criotubos estéreis, livres de DNA humano, DNase e RNase (Cryo.s, Greiner Bio-One, Germany), imersas em RNA later (Ambion, Austin/Texas/USA) e mantidas a -80°C.

No momento da coleta dos tecidos, separou-se parte deles para análise anatomopatológica. Nas amostras endometriais, esses estudos permitiram confirmar a fase do ciclo menstrual e, nas lesões endometrióticas, houve a confirmação histológica da doença. A técnica de parafinação e a confecção dos blocos de tecidos foram realizadas de acordo com as padronizações de cada laboratório, bem como os parâmetros para datação endometrial.

Posteriormente, as amostras foram separadas de acordo com a fase do ciclo menstrual em que foram coletadas para a análise comparativa entre os grupos. Vale ressaltar que apenas as amostras obtidas durante a fase secretória foram analisadas.

3.5.2 Grupo controle

Nas pacientes do grupo controle, procedeu-se a obtenção de amostras endometriais utilizando-se a cânula de Pipelle (Pipelle de Cornier, Laboratoire C. C. D., Paris-France) sem sedação, sob técnica padronizada. Esse procedimento foi executado pelo pesquisador e outros médicos afeitos ao procedimento.

3.6 Extração de RNA

A extração de RNA total das amostras endometriais e de tecido endometriótico foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), segundo o protocolo do fabricante. O RNA extraído foi, então, submetido à análise quantitativa pelo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). A seguir, as amostras foram diluídas para 20 ng/uL (nanogramas/microlitro) com a intenção de facilitar o manuseio para as reações seguintes.

3.7 Análise pelo RT-qPCR

Para os miRNAs, foi realizada a reação de transcrição reversa com *probes* específicos para os miRNAs analisados, utilizando o *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, USA). A seguir, a expressão do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o *TaqMan® miR Assays* e o *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, USA).

Para a análise da expressão gênica de mRNA alvos, obteve-se o cDNA utilizando o kit *High Capacity cDNA synthesis* (Applied Biosystems, USA). A seguir, utilizou-se *primers* específicos para FKBP52 e RPS17 e o kit *PCR Master Mix* (Applied Biosystems, USA) para sua análise de RT-qPCR.

Por fim, confeccionaram-se os pratos de PCR com 96 poços os quais foram analisados pelo sistema de RT-qPCR Vii A7 (Applied Biosystems, USA).

Todas as reações de RT-qPCR foram realizadas em duplicata e por 40 ciclos. A expressão relativa foi calculada pelo método delta-delta C_t ⁵⁴. Para estimar a diferença de expressão, utilizou-se o *fold change* que foi calculado pela razão entre as médias de expressão relativa. Para os miRNA, utilizou-se o siRNA U6 como controle interno e para a expressão gênica, o gene codificador da proteína RPS17.

3.8 Análise estatística

As variáveis numéricas foram apresentadas como média e desvio padrão e, devido ao tamanho amostral limitado, optou-se pelos testes estatísticos não paramétricos. Dessa forma, para a comparação dos dados entre os grupos, utilizou-se o teste de Mann Whitney. As variáveis nominais foram apresentadas como porcentagem e as frequências comparadas por meio do teste de qui-quadrado. O nível de significância considerado foi de 5%.

4 Resultados

4 RESULTADOS

Foram incluídas, neste estudo, 26 pacientes cujas características podem ser observadas na Tabela 1. Quinze mulheres com média de idade de 35,2 anos ($\pm 3,5$) e índice de massa corporal (IMC) médio de 22,1 kg/m² ($\pm 1,9$) apresentaram alterações de endometriose profunda à ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal e foram incluídas no grupo de estudo. Para o grupo controle, foram incluídas 11 mulheres com média de idade de 37,9 anos ($\pm 4,8$) e IMC médio de 22,4 kg/m² ($\pm 3,4$).

Nenhuma das pacientes era tabagista. Nove indivíduos (60%) do grupo de estudo já haviam realizado tratamento de reprodução assistida (fertilização *in vitro*) e do grupo controle, cinco mulheres (45%). No que se refere ao antecedente de abortamento recorrente definido por dois episódios ou mais de perda gestacional⁵⁵, houve duas pacientes (13%) do grupo de estudo e nenhuma do grupo controle.

Na análise comparativa entre os dois grupos, não se observou diferença estatisticamente significativa no que diz respeito às seguintes características: idade, IMC, falhas de FIV e abortamento recorrente.

Tabela 1 - Características dos grupos endometriose e controle - São Paulo, SP - 2012 a 2014

	Grupo de estudo	Grupo controle	p
Idade (anos)¹	35,2 $\pm$ 3,5	37,9 $\pm$ 4,8	0,121
IMC (kg/m²)¹	22,1 $\pm$ 1,9	22,4 $\pm$ 3,4	0,600
Falhas de FIV (%)	60	45	0,918
Abortamento recorrente (%)	13	0	0,525

IMC = índice de massa corporal; FIV = fertilização *in vitro*

¹ Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão

É importante destacar que a maioria das pacientes com endometriose, incluídas neste estudo, segundo classificação da *American Fertility Society*⁵⁶, foram consideradas moderada ou severa. Como revela a Tabela 2, nenhuma das mulheres operadas apresentava a classificação mínima, ao passo que 80% delas era moderada ou severa.

Tabela 2 - Estadiamento cirúrgico da endometriose segundo a *American Fertility Society*, 1996 - São Paulo, SP - 2012 a 2014

Estadiamento	Grupo de estudo
Mínima (rAFS I)	0
Leve (rAFS II)	3 (20%)
Moderada (rAFS III)	3 (20%)
Severa (rAFS IV)	9 (60%)

rAFS - *revised American Fertility Society*

Valores expressos em número e porcentagem

A seguir, para a análise da expressão de RNAs, as amostras foram separadas de acordo com a fase do ciclo menstrual, como mostra a Tabela 3. No grupo controle, obtiveram-se três (27%) amostras endometriais da fase proliferativa e oito (73%), da fase secretória. No grupo de estudo, os espécimes analisados incluem endométrio no pré-operatório, lesão de endometriose e endométrio no pós-operatório. Das amostras endometriais pré-operatórias, seis (40%) são de fase proliferativa e nove (60%), de fase secretória. Das lesões de endometriose, cinco (36%) são de fase proliferativa e nove (64%), de fase secretória. E, dos espécimes endometriais pós-operatórios, sete (64%) são de fase proliferativa e quatro (36%), de fase secretória.

Vale ressaltar que em umas das pacientes com endometriose, não houve coleta de amostra de lesão de endometriose profunda. Em quatro pacientes, não foi possível realizar a amostragem endometrial pós-operatória.

Tabela 3 - Caracterização das amostras teciduais analisadas segundo fase do ciclo menstrual - São Paulo, SP - 2012 a 2014

	Grupo de estudo	Grupo controle
Endométrio pré-operatório fase proliferativa	6 (40%)	3 (27%)
Endométrio pré-operatório fase secretória	9 (60%)	8 (73%)
Lesão peritoneal fase proliferativa	5 (36%)	NA ¹
Lesão peritoneal fase secretória	9 (64%)	NA ¹
Endométrio pós-operatório fase proliferativa	7 (64%)	NA ¹
Endométrio pós-operatório fase secretória	4 (36%)	NA ¹

Valores expressos em número e porcentagem

¹ NA - não se aplica

4.1 Análise de MiRNAs

4.1.1 MiRNA-21

O Gráfico 1, em diagrama de barras, mostra a expressão de miRNA-21 nos diferentes tecidos em relação ao RNA nuclear pequeno (snRNA) U6. Semelhantemente, a Tabela 4 demonstra as relações entre essas expressões em relação ao grupo controle.

Observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa nas expressões de miRNA-21, entre os diferentes tecidos, ao serem comparados com o grupo controle.

Gráfico 1 - Expressão do miRNA-21 - São Paulo, SP - 2012 a 2014

miR: miRNA; Eosis: grupo de estudo

Tabela 4 - Relação da expressão de miRNA-21 nas amostras e comparação com o grupo controle - São Paulo, SP - 2012 a 2014

	Média da expressão relativa	Desvio padrão	p	<i>Fold change</i>
Controle	1,01	0,34		
Estudo pré-operatório	1,25	0,64	0,396	1,24
Lesão	2,32	2,19	0,396	2,30
Estudo pós-operatório	1,01	0,23	0,759	1,00

As comparações entre as amostras do grupo de estudo pré-operatório e lesão, pré-operatório e pós-operatório e lesão e pós-operatório não foram estatisticamente significantes, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação da expressão do miRNA-21 entre as amostras do grupo de estudo - São Paulo, SP - 2012 a 2014

	p	<i>Fold change</i>
Pré-op x Lesão	0,773	1,85
Pré-op x Pós-op	0,724	1,24
Lesão x Pós-op	0,724	2,30

4.1.2 MiRNA-451

Os dados do Gráfico 2, bem como da Tabela 6, revelam as expressões do miRNA-451 nas amostras e suas relações. Nota-se que a expressão desse miRNA tem maior nível nas lesões de endometriose em comparação ao endométrio do grupo controle ($p = 0,007$ e *fold change* = 13,0). Nas outras análises, não foram observadas relações estatisticamente significantes no que concerne à contraposição da expressão do miRNA-451 em relação ao grupo controle.

Gráfico 2 - Expressão de miRNA-451 - São Paulo, SP - 2012 a 2014

miR: miRNA; Eosis: grupo de estudo

Tabela 6 - Relação da expressão de miRNA-451 nas amostras e comparação com o grupo controle - São Paulo, SP - 2012 a 2014

	Média da expressão relativa	Desvio padrão	p	Fold change
Controle	0,98	0,46		
Estudo pré-operatório	1,17	0,84	0,86	1,20
Lesão	12,68	16,99	0,007	13,00
Estudo pós-operatório	2,41	2,07	0,153	2,47

Comparando as amostras do grupo de estudo, observa-se que a expressão relativa de miRNA-451 nas lesões de endometriose profunda é significativamente maior do que no endométrio dessas pacientes ($p = 0,043$ e *fold change* = 10,86). Já as comparações das amostras pré-operatório e pós-operatório e lesão e pós-operatório não mostrou diferença estatística, apesar de apresentarem *fold change* significativo (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparação da expressão do miRNA-451 entre as amostras do grupo de estudo - São Paulo, SP - 2012 a 2014

	p	<i>Fold change</i>
Pré-op x Lesão	0,043	10,86
Pré-op x Pós-op	0,289	2,06
Lesão x Pós-op	0,157	5,27

4.1.3 MiRNA-29c

Diferentemente dos miRNAs -21 e-451, a análise de expressão relativa do miRNA-29c revela diferenças de expressão entre os tecidos, como mostram o Gráfico 3 e a Tabela 6.

A expressão é maior no endométrio de pacientes com endometriose ao comparar com as do grupo controle ($p = 0,002$). Parece ser ainda maior nas lesões de endometriose quando comparadas a esse mesmo grupo. Nesse caso, apesar de não apresentar diferença estatística significativa ($p = 0,059$), tem *fold change* expressivo (6,53). Após a cirurgia, os níveis de miRNA-29c caem e equiparam-se aos níveis do grupo controle ($p = 0,734$).

Gráfico 3 - Expressão de miRNA-29c - São Paulo, SP - 2012 a 2014

miR: miRNA; Eosis: grupo de estudo

Tabela 8 - Relação da expressão de miRNA-29c nas amostras e comparação com o grupo controle - São Paulo, SP - 2012 a 2014

	Média da expressão relativa	Desvio padrão	p	<i>Fold change</i>
Controle	1,08	0,41		
Estudo pré- operatório	2,62	1,39	0,002	2,44
Lesão	7,03	6,91	0,059	6,53
Estudo pós- operatório	0,98	0,47	0,734	1,09

Verifica-se, na Tabela 9, que a análise das amostras do endométrio pré-operatório mostrou maior expressão do miRNA-29c em relação às amostras do endométrio pós-operatório ($p = 0,021$ e *fold change* = 2,67). Resultado não obtido ao comparar os grupos pré-operatório e lesão e lesão e pós-operatório, apesar da expressão gênica comparativa apresentar *fold change* significativo.

Tabela 9 - Comparação da expressão do miRNA-29c entre as amostras do grupo de estudo - São Paulo, SP - 2012 a 2014

	p	<i>Fold change</i>
Pré-op x Lesão	0,501	2,68
Pré-op x Pós-op	0,021	2,67
Lesão x Pós-op	0,089	7,15

4.2 Análise da proteína FKBP52

A expressão relativa do mRNA que codifica a proteína FKBP52 utilizando a RPL17 como controle interno é menor no endométrio das pacientes com endometriose em relação àquelas do grupo controle ($p = 0,005$ e *fold change* = 1,88), assim como nas lesões endometrióticas comparadas ao mesmo grupo ($p < 0,001$ e *fold change* = 3,19). Após o tratamento cirúrgico da endometriose, a expressão da FKBP52 aumenta e assemelha-se à do grupo controle ($p = 0,61$), como mostram o Gráfico 4 e a Tabela 10.

Gráfico 4 - Expressão da proteína FKBP52 - São Paulo, SP - 2012 a 2014

Eosis: grupo de estudo

Tabela 10 - Relação da expressão da FKBP52 nas amostras e comparação com o grupo controle - São Paulo, SP - 2012 a 2014

	Média da expressão relativa	Desvio padrão	p	Fold change
Controle	1,05	0,30		
Estudo pré-operatório	0,56	0,14	0,005	1,88
Lesão	0,33	0,15	<0,001	3,19
Estudo pós-operatório	1,19	0,62	0,61	1,13

A expressão relativa das lesões de endometriose é menor quando comparada ao endométrio pré-operatório ($p = 0,009$ e *fold change* = 1,69) e ao pós-operatório ($p = 0,02$ e *fold change* = 3,62). Apesar de apresentar expressão 2,14 maior no endométrio pós-operatório, quando comparada ao pré-operatório, essa diferença não se mostrou estatisticamente significativa, como mostra a Tabela 11.

Tabela 11 - Comparação da expressão da FKBP52 entre as amostras do grupo de estudo - São Paulo, SP - 2012 a 2014

	p	<i>Fold change</i>
Pré-op x Lesão	0,009	1,69
Pré-op x Pós-op	0,09	2,14
Lesão x Pós-op	0,02	3,62

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

5.1 Conduta cirúrgica na endometriose

A opção pelo tratamento cirúrgico da endometriose associado à infertilidade é um desafio corriqueiro no cotidiano dos que militam na medicina reprodutiva. Trata-se de decisão que envolve diversas informações como a idade, reserva ovariana e outras causas de infertilidade.

Para os casos de endometriose mínima ou leve (rAFS I e II), em relação ao tratamento cirúrgico, os consensos apontam melhores taxas de gravidez espontânea ou quando realizam tratamento de reprodução assistida⁵⁷⁻⁵⁹. Por outro lado, o benefício da cirurgia para os casos de endometriose moderada ou severa (rAFS III e IV) não é unânime na literatura^{17,58}. No entanto, fruto de uma rotina rígida e completa na abordagem das pacientes com endometriose, demonstrou-se, em pesquisa anterior, que aquelas pacientes que foram submetidas ao tratamento cirúrgico dessa doença, antes do tratamento de reprodução assistida, tiveram melhores taxas de gravidez²⁰. Dessa maneira, com a intenção de explorar os caminhos moleculares que possam explicar os resultados do estudo referido, sob a mesma rotina de abordagem das pacientes com endometriose do estudo mencionado, construiu-se o presente estudo.

5.2 Diagnóstico ultrassonográfico da endometriose

Trata-se de um ponto de discussão a divisão dos grupos de estudo baseada no resultado da ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal. Sabe-se que o padrão ouro para o diagnóstico da endometriose é a laparoscopia com biópsia das áreas suspeitas e corroboração anatomo-patológica⁵⁷. No entanto, do ponto de vista prático, submeter todas as

pacientes inférteis à intervenção videolaparoscópica sob a premissa investigativa não é factível.

A alta prevalência dessa enfermidade nas mulheres inférteis obriga o clínico a incluir essa hipótese em sua propedêutica⁶. Considerando que uma parcela das mulheres com endometriose relata pouco ou nenhum sintoma⁶⁰, nota-se uma demanda de exames dirigidos para o seu diagnóstico. Nesse contexto, incluiu-se a ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal na propedêutica do casal infértil. Em estudo comparativo em relação ao exame de toque vaginal e à ressonância nuclear magnética, a ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal mostrou melhor sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia para o diagnóstico de endometriose profunda retrocervical e do retossigmóide⁶¹.

No presente estudo, o grupo controle é constituído de mulheres sem alterações na ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal. Apesar de apresentar a desvantagem de não passarem pelo teste padrão ouro para o diagnóstico da endometriose, refletem melhor a prática clínica e, assim, seus desdobramentos práticos são mais condizentes com a aplicabilidade no cotidiano do clínico em medicina reprodutiva.

5.3 MiRNAs e fase do ciclo menstrual

As alterações hormonais que controlam o ciclo menstrual causam modificações nos órgãos pélvicos. Imagina-se, por isso, que os processos moleculares envolvidos, incluindo os miRNAs, também sofram alterações durante o ciclo.

Rekker et al. recrutaram 9 pacientes saudáveis e coletaram amostras de sangue em 4 períodos do ciclo menstrual: primeiro dia do ciclo, sétimo dia do ciclo, dia do pico de LH e sétimo dia após pico de LH. Analisaram o perfil de miRNAs (375 miRNAs) nessas diferentes fases de amostras de sangue total e de plasma. Não houve diferença na expressão dos miRNAs

nos diferentes momentos do ciclo menstrual e, por fim, concluíram que as alterações cíclicas nas mulheres não afetaram a expressão de miRNAs no sangue⁶².

Por outro lado, apesar de não haver evidências de diferenças no nível sérico, a expressão de miRNAs no endométrio não é a mesma nos diferentes momentos do ciclo menstrual. Kuokannen et al. realizaram estudo a fim de relacionar o perfil de miRNAs e mRNAs no endométrio de fase proliferativa tardia e de fase secretória média. Submeteram essas amostras endometriais a estudo de microssérie de miRNAs e de mRNAs. Além de descreverem perfis diferentes de miRNAs expressos nessas duas diferentes fases do ciclo menstrual, notaram que alguns miRNAs reguladores do ciclo celular estavam com expressão maior na fase secretória média em relação à proliferativa tardia⁶³.

Outros estudos similarmente corroboram a expressão dos miRNAs relacionada à fase do ciclo menstrual. Alguns estudos descrevem a expressão dos miRNAs influenciada pelos esteroides, como o estradiol e a progesterona⁶⁴: por exemplo, o miRNA 145 que pode diminuir a tradução do receptor de estrogênio alfa por se ligar ao mRNA dessa proteína e inibir sua tradução⁶⁵. Outro estudo demonstra diferença de expressão de alguns miRNAs entre a fase proliferativa e secretória, em amostras de endométrio de pacientes sem endometriose e de endometriomas, mas não em amostras de endométrio de pacientes com endometriose e de lesões peritoneais e retrocervicais⁶⁶.

De maneira semelhante, a expressão da FKBP52 também é dependente da fase do ciclo menstrual. Yang et al., ao demonstrar uma provável regulação da expressão da FKBP52 pelo fator de transcrição homeobox A10 (HOXA10), notaram que ambas as moléculas tinham expressão diferente nas fases proliferativa e secretória em um modelo de cultura de células estromais de endométrio humano²⁶.

Considerando-se essas observações e que a racionalidade do presente estudo baseia-se em um possível benefício do tratamento cirúrgico

da endometriose no que concerne à infertilidade, mais especificamente à implantação embrionária, optou-se pela inclusão apenas das amostras coletadas durante a fase secretória do ciclo menstrual. Tal fato reduziu o tamanho da amostra o que incorreu na restrição do poder de distinção das análises estatísticas. Nesse sentido, ainda cabe mencionar a dificuldade encontrada para incluir amostras de endométrio do pós-operatório. Não apenas relacionada à fase menstrual, mas também outros fatores dificultaram a amostragem desse grupo, como: gravidez espontânea após a cirurgia, falta de indicação de biópsia endometrial após a cirurgia e demora ou não retorno ao tratamento reprodutivo após o procedimento cirúrgico.

5.4 MiRNA-21

O miRNA-21 é um dos mais antigos descrito nos mamíferos e tem a sua sequência bem conservada por meio da evolução. É codificado pelo gene MIR-21 localizado em região intrônica do cromossomo 17q23.2⁶⁷.

Essa molécula é bastante associada aos cânceres pois tem a função relacionada à proliferação celular e à metástase. Por tal sorte, é considerada um oncomir. Apresenta expressão aumentada em glioblastomas, câncer de mama, pulmão, próstata, cólon, estômago, esôfago, garganta, leiomiossarcoma uterino e linfoma difuso de grandes células B. Além disso, no câncer de pâncreas, sua expressão elevada relaciona-se com metástase hepática e no câncer de mama, com doença avançada, metástase linfática e pior prognóstico⁶⁸.

Em relação à endometriose, Ramón et al. demonstraram expressão aumentada em amostra de endometrioma e de lesão retovaginal em comparação ao endométrio típico de pacientes com endometriose e também em relação ao endométrio de mulheres sem endometriose⁶⁶. Já, em estudo no qual mensurou-se a expressão de miRNAs no plasma sanguíneo, o miRNA-21 apresentou maior expressão em pacientes com endometriose em relação às sem a doença na análise de microssérie (*fold change* = 2,36 e

$p = 0,034$). No entanto, em confirmação com PCR quantitativo em tempo real, essa informação não foi corroborada ($p = 0,41$)⁶⁹.

No presente estudo, a expressão desse miRNA não apresentou diferença estatística significativa entre as diversas amostras. Considerando-se que sua função esteja vinculada à proliferação celular, esperava-se encontrar maior expressão nas amostras de lesões em relação ao endométrio das pacientes com e sem endometriose, supondo-se que o endométrio refluído para a cavidade abdominal teria maior capacidade de proliferação. Apesar de não apresentarem significância estatística, analisando apenas os *fold changes*, poder-se-ia inferir algo semelhante ao esperado. As lesões de endometriose apresentam *fold change* de 2,30 em relação ao endométrio do grupo controle e de 1,85 e 2,30 em relação ao endométrio do grupo endometriose, antes e após a cirurgia, respectivamente.

5.5 MiRNA-451

Em estudo realizado por meio de amostras de sangue de mulheres saudáveis, dos 375 miRNAs analisados, o miRNA-451 foi o mais abundante⁶². Trata-se de uma molécula traduzida pelo gene MIR451 localizado no cromossomo 17q11.2⁷⁰.

Dentre suas funções, pode-se citar: proliferação, diferenciação, migração e invasão celular. Semelhante ao miRNA-21, também está relacionado a diversos tipos de câncer, como gastrointestinal, glioma, esofageano, mama, osteossarcoma e vesical⁷¹.

No que tange à endometriose, Nothnick et al. demonstraram, a partir de modelos em ratos, que a expressão diminuída do miRNA-451 endometrial não é causa, mas consequência da doença. Relataram também que esse perfil de expressão diminuída não contribui para o tecido que refluí para a cavidade abdominal originar uma lesão de endometriose⁷¹. Os dados obtidos por meio do modelo de babuínos são consoantes com esses dados e também mostraram expressão reduzida do miRNA-451, após a indução da

endometriose. No entanto, diferente do estudo anterior, esse demonstrou que o miRNA-451 contribui para a fisiopatologia da endometriose por aumentar a proliferação celular devido à elevação da proteína YWHAZ, um dos alvos desse miRNA⁴⁶.

Hawkins et al. utilizaram a análise de microssérie para traçar o perfil de miRNAs diferentemente expressos no endométrio de pacientes com endometriose em relação ao tecido de endometrioma. Dentre outros miRNAs, demonstraram que o -451 tem maior expressão no endometrioma⁷².

Os dados obtidos neste estudo são condizentes com o trabalho de Hawkins et al. pois se verificou maior expressão do miRNA-451 nas amostras de lesão de endometriose em relação ao endométrio do grupo controle ($p = 0,07$ e *fold change* = 13,00) e em relação ao endométrio das pacientes com endometriose ($p = 0,04$ e *fold change* = 10,86). Porém, não foi condizente com os estudos de modelos em animais pois, a expressão desse miRNA, comparando o grupo controle com aquele com endometriose pré-operatório, não apresentou diferença estatisticamente significativa, contrariando a expectativa de diminuição nesse grupo.

5.6 MiRNA-29c

O miRNA-29c é codificado pelo gene MIR29c que está localizado no cromossomo 1q32.2^{73,74}. Considerando as diferentes fases do ciclo menstrual, apresenta expressão mais alta na fase secretória média em relação à proliferativa tardia, como mostra o estudo de Kuokkanen et al.⁶³. Portanto, isso sugere que esse miRNA tem relação com a progesterona.

Além disso, atribui-se como funções, o remodelamento da matriz extra-celular e ação como supressor de metástase. Está relacionado a alguns tipos de cânceres, como de nasofaringe e leucemia linfocítica crônica, principalmente naqueles com elevada capacidade de invasão e metástase⁶⁸.

Em relação à endometriose, os resultados obtidos no presente estudo mostram que a expressão do miRNA-29c é maior no endométrio das

pacientes com endometriose profunda em relação ao grupo controle. É ainda maior nas lesões de endometriose e, após a cirurgia, restaura-se para níveis similares ao do grupo controle. A comparação do grupo lesão e o grupo controle não apresenta diferença estatisticamente significativa ($p = 0,059$), no entanto, apresenta *fold change* expressivo (6,53).

Esses dados são condizentes com alguns dados da literatura. Ohlsson Teague et al. mostraram que esse miRNA está aumentado no endométrio ectópico em relação ao tópico em amostras pareadas⁷⁵. Hawkins et al. notaram expressão aumentada do miRNA-29c ao comparar amostras de endometriomas à de endométrio de pacientes sem endometriose. Ruan et al. descreveram níveis aumentados de miRNA-29c no endométrio de pacientes com endometriose em relação ao de pacientes sem endometriose⁷⁶.

Contrapondo a maioria das evidências, há um estudo que relatou expressão para baixo do miRNA-29c em endométrio ectópico em relação ao tópico. Concluiu, ainda, que essa molécula é um supressor da endometriose por inibir a proliferação, invasão e apoptose das células endometriais⁷⁷.

5.7 FKBP52

A FKBP52 é uma proteína codificada pelo gene FKBP4 que se encontra no cromossomo 12p13.33⁷⁸. Como foi mencionado, está relacionada ao receptor de progesterona e o regula positivamente. Na endometriose, parece ter papel na etiopatogenia²⁴ e na receptividade endometrial e infertilidade associada²⁶.

A ferramenta Targetscan (www.targetscan.org) revela que o mRNA que traduz a proteína FKBP52 é um dos alvos do miRNA-29c. O sítio de ligação está descrito na Figura 3.

Figura 3 - Sítio de ligação miRNA-29c e FKBP52

Os dados obtidos neste estudo mostram que o comportamento da expressão dessa proteína é inversa ao do miRNA-29c. O endométrio de pacientes com endometriose apresenta menor expressão da FKBP52 em relação ao grupo controle. Após o tratamento cirúrgico, ocorre aumento dos níveis de expressão do mRNA dessa proteína, níveis esses que se tornam equiparáveis aos do grupo controle. Além disso, a expressão da FKBP52 é menor na lesão de endometriose quando comparada ao endométrio do grupo controle e ao das pacientes com endometriose antes e após a cirurgia.

Os níveis diminuídos da expressão dessa proteína no endométrio de pacientes com endometriose também foram descritos em outros estudos^{24,26} e podem explicar a decidualização alterada e a infertilidade relacionada à implantação embrionária. Nota-se, também, que os menores níveis de expressão da FKBP52 ocorrem nas lesões de endometriose, o que corrobora o estudo de Hirota et al., no qual descreveram a promoção das lesões de endometriose pela redução da FKBP52²⁴.

A relação entre as expressões do miRNA-29c e da FKBP52 não tem precedentes na literatura médica. Apesar de carecer de outras evidências como expressão em nível proteico ou estudos funcionais, os dados obtidos no presente estudo, mesmo que de forma inicial, mostram um provável papel do miRNA-29c por meio da modulação da expressão da FKBP52 na etiopatogenia da endometriose, bem como um mecanismo que explica a alteração na decidualização e consequente contribuição para a infertilidade. Esses processos podem ser revertidos pelo tratamento cirúrgico da endometriose com remoção das lesões, como se pode inferir pelo retorno da expressão do miRNA-29c e da FKBP52 para níveis semelhantes ao do

endométrio de mulheres sem endometriose após a cirurgia, conforme se constatou no presente estudo.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

A análise dos dados obtidos permite concluir:

- a) A análise da expressão do miRNA-21 nas diferentes amostras não demonstrou diferenças estatisticamente significantes;
- b) A análise da expressão do miRNA-451 não evidenciou diferença estatística significativa no endométrio das pacientes com endometriose em comparação às das mulheres sem endometriose. Por outro lado, a expressão do miRNA-451 nas lesões de endometriose foi significativamente maior do que no endométrio do grupo controle, bem como no das pacientes do grupo endometriose pré-operatório;
- c) Em relação ao miRNA-29c, verificou-se expressão aumentada no endométrio de pacientes do grupo endometriose em relação ao controle. Após o tratamento cirúrgico, a expressão desse miRNA retorna a níveis semelhantes aos do grupo controle. Além disso, nas lesões de endometriose a sua expressão não mostrou diferença estatística significativa em relação ao endométrio do grupo controle ($p = 0,059$), porém, o *fold change* foi expressivo (6,53);
- d) A avaliação da proteína FKBP52 analisada pela expressão de seu mRNA apresentou comportamento inverso ao do miRNA-29c. A expressão foi menor no endométrio de pacientes com endometriose em relação às sem endometriose e ainda menor nas lesões de endometriose. Após a remoção das lesões endometrióticas, a expressão da FKBP52 é restaurada para níveis semelhantes ao do endométrio de mulheres do grupo controle.

7 Anexos

7 ANEXOS

Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil de expressão de microRNAs em pacientes inférteis com endometriose antes e após a remoção cirúrgica do tecido ectópico

Pesquisador: Edmund Chada Baracat

Área Temática: Área 2. Reprodução Humana.
(Trata-se de pesquisa envolvendo reprodução humana não contemplada acima.);

Versão: 2

CAAE: 07272613.1.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 256.991

Data da Relatoria: 24/04/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo que visa identificar microRNAs diferentemente expressos em pacientes com endometriose antes e após a cirurgia e confrontar os dados com um grupo de pacientes inférteis sem endometriose (fator masculino ou tubáreo).

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo primário é verificar o efeito da cirurgia de remoção do tecido endometrial ectópico sobre a expressão de microRNAs em pacientes com endometriose estádios II, III e IV e o secundário identificar microRNAs diferentemente expressos em pacientes com endometriose e pacientes sem endometriose; correlacionar a expressão de microRNAs endometriais com as características gerais e reprodutivas de pacientes com ou sem endometriose; Estudar o perfil de microRNAs diferentemente expressos através de bioinformática com o objetivo de identificar possíveis mecanismos que expliquem a fisiopatologia da endometriose.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

As pacientes do grupo ENDOMETRIOSE serão submetidas a procedimento cirúrgico para tratamento de sua doença e, dessa forma, apresenta riscos inerentes ao procedimento. E as pacientes do grupo CONTROLE serão submetidas a biópsia endometrial e consequentemente sujeitas a raras complicações, tais como sangramento uterino e perfuração uterina.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 455

Bairro: PACAEMBU

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3061-8004

CEP: 01.246-903

E-mail: cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um trabalho científico com objetivo bem elaborado e bem estruturado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termo de Consentimento Livre Esclarecido bem elaborado, de acordo com as exigências contidas na Resolução CNS 196/96. A linguagem utilizada acessível, e contempla todas as etapas e procedimentos que serão utilizados durante o Estudo.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não apresenta pendência.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

SAO PAULO, 26 de Abril de 2013

Assinador por:
Roger Chammas
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 455

Bairro: PACAEMBU

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3061-8004

CEP: 01.246-903

E-mail: cep.fm@usp.br

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Grupo de Estudo

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO 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 “**Perfil de expressão de MicroRNAs em pacientes inférteis com endometriose antes e após a remoção cirúrgica do tecido ectópico**”
2. PESQUISADOR Executante: Eduardo Hideki Miyadahira
PESQUISADOR Responsável : Edmund Chada Baracat
CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular da Disciplina de Ginecologia.
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 28.085
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO ☒	RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐	RISCO MAIOR ☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): **Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. Sabe-se que algumas pacientes beneficiam-se da cirurgia de remoção do tecido ectópico da endometriose. Dessa forma, os objetivos deste estudo são identificar microRNAs (pequenas moléculas de RNA) diferentemente expressos em pacientes com endometriose e pacientes sem endometriose; verificar se após a remoção cirúrgica do tecido endometrial ectópico há alteração na expressão de microRNAs em pacientes com endometriose; relacionar a expressão de microRNAs endometriais com as características gerais e reprodutivas de pacientes com ou sem endometriose.**

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: **Serão executados:**

- a) **Ultrassom transvaginal com preparo intestinal e/ou ressonância magnética para pesquisa de endometriose profunda.** Estes exames são pouco invasivos, com raras complicações e têm duração de aproximadamente uma hora ambos. No caso do ultrassom, o desconforto se deve somente pela via o qual é realizada, a transvaginal e não tem complicações. E, no caso da ressonância, é um exame indolor, apenas chama-se a atenção para as pessoas que tem claustrofobia (incômodo ao permanecer em lugares fechados), pois ele é realizado em uma câmara fechada. A complicação mais comum é a reação alérgica ao contraste utilizado no exame.
- b) **Biópsia endometrial, antes e após cirurgia para tratamento da endometriose, através da técnica utilizada na rotina clínica, não havendo, portanto, maior risco durante ou após o procedimento cirúrgico.** Neste procedimento, iremos realizar um exame especular ginecológico e, após visualização do colo do útero, um fino catéter é colocado dentro da cavidade do útero. Por meio de vácuo, uma pequena amostra de endométrio (camada interna do útero) é aspirada. Este pequeno procedimento, não requer obrigatoriamente uma anestesia, porém pode causar dor em cólica no momento que o catéter é inserido dentro da cavidade do útero que, geralmente, é suportável. Tem duração de aproximadamente 15 minutos. As complicações são raras e as mais comuns

são o falso trajeto dentro do útero e o sangramento aumentado após o procedimento.

- c) **Retirada de amostra de sangue por punção periférica, antes e após a cirurgia para tratamento da endometriose, a qual também é utilizada na rotina clínica.** A punção de veia periférica é um pequeno procedimento rápido (aproximadamente 5 minutos) e pouco doloroso. Utilizamos uma agulha fina para acessar o interior do vaso sanguíneo e coletar amostra de sangue. A complicação mais comum é a transfixação da veia puncionada.
- d) **Cirurgia laparoscópica por técnica convencional previamente indicada por suspeita clínica e/ou radiológica de endometriose, no qual serão realizadas biópsias do tecido endometrial e do tecido ectópico. A técnica cirúrgica aplicada será a mesma utilizada normalmente na prática clínica, não havendo, portanto, maior risco durante ou após o procedimento cirúrgico.** Trata-se de cirurgia realizada por técnica conhecida como "minimamente invasiva" pois os cortes realizados na pele são pequenos. A duração da cirurgia é variável e depende da extensão da sua doença. As complicações mais comuns são a dor pós-operatória e a lentidão do trânsito intestinal, quadro conhecido como íleo paralítico.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: **Ultrassom transvaginal realizado por técnica convencional e por operador qualificado ou ressonância nuclear magnética; biópsia endometrial realizada com Catéter de Pipelle sob técnica convencional; coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; cirurgia para tratamento da endometriose por vídeo-laparoscopia realizada por cirurgião especializado.**

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos: **Não haverá nenhum desconforto ou risco adicional durante a realização da pesquisa já que os procedimentos fazem parte do tratamento proposto para dor e/ou infertilidade.**

5 – Benefícios para o participante: **Não há benefício direto para o participante visto que o presente estudo não tem por objetivo estabelecer novo tratamento para a endometriose. No entanto, o avanço na compreensão dos mecanismos envolvidos nesta doença pode proporcionar o estudo de novas alternativas de tratamento. Além disso, seus dados serão mantidos em sigilo absoluto.**

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: **O tratamento proposto contempla o quadro clínico de cada paciente, desta forma, entende-se que esta é a alternativa mais adequada.**

7 – Garantia de acesso: **em qualquer momento do estudo, a senhora terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal é o Dr. Eduardo Hideki Miyadahira que pode ser encontrado no endereço: Av. Dr. Enéas de Carvalho, 255, Instituto Central, Ginecologia, 10º andar, fone: 2661-6647 (Clínica Ginecológica). Caso tenha alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 2º andar– tel: 3061-8004, FAX: 3061-8004 – E-mail: cep.fm@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;

09 – Direito de confidencialidade – **As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as demais pacientes, não sendo divulgada a sua identificação;**

10 – Direito de ser mantida atualizada sobre os resultados parciais e totais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: **não há despesas adicionais para o participante em qualquer fase do estudo, apenas os relacionados ao tratamento proposto. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.**

12 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

13 - Compromisso do pesquisador de armazenar as amostras coletadas em local seguro e utilizá-las somente para este estudo.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "**Perfil de expressão de MicroRNAs em pacientes inférteis com endometriose antes e após a remoção cirúrgica do tecido ectópico**".

Eu discuti com o Dr. Eduardo Hideki Miyadahira 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

Data ____ / ____ / ____

(para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Grupo Controle

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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 “**Perfil de expressão de MicroRNAs em pacientes inférteis com endometriose antes e após a remoção cirúrgica do tecido ectópico**”
2. PESQUISADOR Executante: Eduardo Hideki Miyadahira
 PESQUISADOR Responsável : Edmund Chada Baracat
 CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular da Disciplina de Ginecologia.
 INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 28.085
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO X	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO ☐	RISCO MAIOR	☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): **Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. Sabe-se que algumas pacientes beneficiam-se da cirurgia de remoção do tecido ectópico da endometriose. Dessa forma, os objetivos deste estudo são identificar microRNAs (pequenas moléculas de RNA) diferentemente expressos em pacientes com endometriose e pacientes sem endometriose; verificar se após a remoção cirúrgica do tecido endometrial ectópico há alteração na expressão de microRNAs em pacientes com endometriose; relacionar a expressão de microRNAs endometriais com as características gerais e reprodutivas de pacientes com ou sem endometriose. No seu caso, como não há evidência clínica ou radiológica de endometriose gostaríamos de incluí-la dentro do grupo de comparação às pacientes com endometriose, aproveitando a biópsia endometrial que faz parte do seu tratamento.**

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: **Serão executados:**

- a) **Ultrassom transvaginal com preparo intestinal e/ou ressonância magnética para pesquisa de endometriose profunda.** Estes exames são pouco invasivos, com raras complicações e têm duração de aproximadamente uma hora ambos. No caso do ultrassom, o desconforto se deve somente pela via o qual é realizada, a transvaginal e não tem complicações. E, no caso da ressonância, é um exame indolor, apenas chama-se a atenção para as pessoas que tem claustrofobia (incômodo ao permanecer em lugares fechados), pois ele é realizado em uma câmara fechada. A complicação mais comum é a reação alérgica ao contraste utilizado no exame.
- b) **Biópsia endometrial através da técnica utilizada na rotina clínica, não havendo, portanto, maior risco durante ou após o procedimento cirúrgico.** Neste procedimento, iremos realizar um exame especular ginecológico e, após visualização do colo do útero, um fino catéter é colocado dentro da cavidade do útero. Por meio de vácuo, uma pequena amostra de endométrio (camada interna do útero) é aspirada. Este pequeno procedimento, não requer obrigatoriamente uma anestesia, porém pode causar dor em cólica no momento que o catéter é inserido dentro da cavidade do útero que, geralmente, é suportável. Tem duração de

aproximadamente 15 minutos. As complicações são raras e as mais comuns são o falso trajeto dentro do útero e o sangramento aumentado após o procedimento.

- c) Retirada de amostra de sangue por punção periférica a qual também é utilizada na rotina clínica.** A punção de veia periférica é um pequeno procedimento rápido (aproximadamente 5 minutos) e pouco doloroso. Utilizamos uma agulha fina para acessar o interior do vaso sanguíneo e coletar amostra de sangue. A complicação mais comum é a transfixação da veia puncionada.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: **Ultrassom transvaginal realizado por técnica convencional e por operador qualificado ou ressonância nuclear magnética; biópsia endometrial realizada com Catéter de Pipelle sob técnica convencional; coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço.**

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos: **Não haverá nenhum desconforto ou risco adicional durante a realização da pesquisa já que os procedimentos fazem parte do tratamento proposto para dor e/ou infertilidade.**

5 – Benefícios para o participante: **Não há benefício direto para o participante visto que o presente estudo não tem por objetivo estabelecer novo tratamento para a endometriose. No entanto, o avanço na compreensão dos mecanismos que causam esta doença pode contribuir para a descoberta ou investigação de novas alternativas de tratamento. Além disso, seus dados serão mantidos em sigilo absoluto.**

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: **O tratamento proposto contempla o quadro clínico de cada paciente, desta forma, entende-se que esta é a alternativa mais adequada.**

7 – Garantia de acesso: **em qualquer momento do estudo, a senhora terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal é o Dr. Eduardo Hideki Miyadahira que pode ser encontrado no endereço: Av. Dr. Enéas de Carvalho, 255, Instituto Central, Ginecologia, 10º andar, fone: 2661-6647 (Clínica**

Ginecológica). Caso tenha alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 2º andar– tel: 3061-8004, FAX: 3061-8004 – E-mail: cep.fm@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;

09 – Direito de confidencialidade – **As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as demais pacientes, não sendo divulgada a sua identificação;**

10 – Direito de ser mantida atualizada sobre os resultados parciais e totais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: **não há despesas adicionais para o participante em qualquer fase do estudo, apenas os relacionados ao tratamento proposto. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.**

12 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

13 - Compromisso do pesquisador de armazenar as amostras coletadas em locais seguros e utilizá-las somente para este estudo.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **"Perfil de expressão de MicroRNAs em pacientes inférteis com endometriose antes e após a remoção cirúrgica do tecido ectópico"**.

Eu discuti com o Dr. Eduardo Hideki Miyadahira 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

Data ____ / ____ / ____

(para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Anexo D - Ilustração auxiliar ao laudo da ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal

* Cedido por Dra. Luciana Chamié

Anexo E - Inventário pélvico cirúrgico (relacionado ao caso do Anexo C)

Anexo F - Aspecto pós-cirúrgico (relacionado ao caso do Anexo C)

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

1. Donoso E, Carvajal JA, Poblete JA. La edad de la mujer como factor de riesgo de mortalidad materna, fetal, neonatal e infantil. *Rev Med Chil.* 2014;142(2):168-74.
2. Carolan M, Frankowska D. Advanced maternal age and adverse perinatal outcome: a review of the evidence. *Midwifery.* 2011;27(6):793-801.
3. INCA. INCA - CÂNCER - Tipo - Mama. [cited 2015 Apr 3]. Available from:
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama++
4. Giudice LC. Endometriosis. *N Engl J Med.* 2010;362(25):2389-98.
5. Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18(2):177-200.
6. Meuleman C, Vandenabeele B, Fieuws S, Spiessens C, Timmerman D, D'Hooghe T. High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners. *Fertil Steril.* 2009;92(1):68-74.
7. Simoens S, Dunselman G, Dirksen C, Hummelshoj L, Bokor A, Brandes I, et al. The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Hum Reprod.* 2012;27(5):1292-9.

8. Nhoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, d'Hoogher T, de Cicco Nardone F, de Cicco Nardone C, et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil Steril*. 2011;96(2):366-73.e8.
9. Levy AR, Osenenko KM, Lozano-Ortega G, Sambrook R, Jeddi M, Bélisle S, Reod RL. Economic burden of surgically confirmed endometriosis in Canada. *J Obstet Gynaecol Can*. 2011;33(8):830-7.
10. Spigolon DN, Amaral VF, Barra CMCM. Endometriose : impacto econômico e suas perspectivas. *Femina*. 2012;40:129-34.
11. Sampson JA. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am J Pathol*. 1927;3(2):93-110.43.
12. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol*. 1984;64(2):151-4.
13. Hastings JM, Fazleabas AT. A baboon model for endometriosis: implications for fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;4 Suppl 1:S7.
14. Macer ML, Taylor HS. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2012;39(4):535-49.
15. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;10(5):261-75.

16. Ferguson BR, Bennington JL, Haber SL. Histochemistry of mucosubstances and histology of mixed müllerian pelvic lymph node glandular inclusions. Evidence for histogenesis by müllerian metaplasia of coelomic epithelium. *Obstet Gynecol.* 1969;33(5):617-25.
17. Pages A. Endometriosis and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2012;98(3):591-8.
18. Akande VA, Hunt LP, Cahill DJ, Jenkins JM. Differences in time to natural conception between women with unexplained infertility and infertile women with minor endometriosis. *Hum Reprod.* 2004;19(1):96-103.
19. Holoch KJ, Lessey BA. Endometriosis and infertility. *Clin Obstet Gynecol.* 2010;53(2):429-38.
20. Bianchi P, Pereira R. Extensive excision of deep infiltrative endometriosis before in vitro fertilization significantly improves pregnancy rates. *J Minim Invasive Gynecol.* 2009;16(2):174-80.
21. Davies TH, Sánchez ER. FKBP52. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(1):42-7.
22. Storer CL, Dickey CA, Galigniana MD, Rein T, Cox MB. FKBP51 and FKBP52 in signaling and disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(12):481-90.
23. Tranguch S, Cheung-Flynn J, Daikoku T, Prapapanich V, Cox MB, Xie H, et al. Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(40):14326-31.

24. Hirota Y, Tranguch S, Daikoku T, Hasegawa A, Osuga Y, Taketani Y, Dey SK. Deficiency of immunophilin FKBP52 promotes endometriosis. *Am J Pathol.* 2008;173(6):1747-57.
25. Jackson KS, Brudney A, Hastings JM, Mavrogianis PA, Kim JJ, Fazleabas AT. The altered distribution of the steroid hormone receptors and the chaperone immunophilin FKBP52 in a baboon model of endometriosis is associated with progesterone resistance during the window of uterine receptivity. *Reprod Sci.* 2007;14(2):137-50.
26. Yang H, Zhou Y, Edelshain B, Schatz F, Lockwood CJ, Taylor HS. FKBP4 is regulated by HOXA10 during decidualization and in endometriosis. *Reproduction.* 2012;143(4):531-8.
27. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
28. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993;75(5):855-62.
29. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000;403(6772):901-6.
30. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2001;294(5543):862-4.
31. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2001;294(5543):858-62.

-
32. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543):853-8.
 33. MiRBase. Homo sapiens miRNAs (1881 sequences). [cited 2015 Apr 7]. Available from: http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa
 34. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20.
 35. Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate microRNA genes. *Science*. 2003;299(5612):1540.
 36. Kim Y-K, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J*. 2007; 26(3):775-83.
 37. Teague EMCO, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update*. 2010;16(2):142-65.
 38. Brodersen P, Voinnet O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(2):141-8.
 39. Gilabert-Estelles J, Braza-Boils A, Ramon LA, Zorio E, Medina P, Espana F, Estelles A. Role of microRNAs in gynecological pathology. *Curr Med Chem*. 2012;19(15):2406-13.

40. Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol*. 2009;112(1):55-9.
41. Häusler SFM, Keller A, Chandran PA, Ziegler K, Zipp K, Heuer S, et al. Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening. *Br J Cancer*. 2010;103(5):693-700.
42. Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*. 2008;452(7189):896-9.
43. Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med*. 2013;368(18):1685-94.
44. Wren JD, Wu Y, Guo S-W. A system-wide analysis of differentially expressed genes in ectopic and eutopic endometrium. *Hum Reprod*. 2007;22(8):2093-102.
45. Pan Q, Luo X, Toloubeydokhti T, Chegini N. The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. *Mol Hum Reprod*. 2007;13(11):797-806.
46. Joshi NR, Su RW, Chandramouli GVR, Khoo SK, Jeong JW, Young SL, et al. Altered expression of microRNA-451 in eutopic endometrium of baboons (*Papio anubis*) with endometriosis. *Hum Reprod*. 2015;30(12):2881-91.

-
47. Saúde CN de. Resolução número 466. 2012. [cited 2015 Jun 7]. Available from:
<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>
 48. Hudelist G, English J, Thomas AE, Tinelli A, Singer CF, Keckstein J. Diagnostic accuracy of transvaginal ultrasound for non-invasive diagnosis of bowel endometriosis: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;37(3):257-63.
 49. Pereira RMA, Zanatta A, de Mello Bianchi PH, Chamié LP, Gonçalves MOC, Serafini PC. Transvaginal ultrasound after bowel preparation to assist surgical planning for bowel endometriosis resection. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;104(2):161.
 50. Chamié LP, Pereira RMA, Zanatta A, Serafini PC. Transvaginal US after bowel preparation for deeply infiltrating endometriosis: protocol, imaging appearances, and laparoscopic correlation. *Radiographics.* 2010;30(5):1235-49.
 51. Pereira RMA, Zanatta A, Preti CDL, de Paula FJF, da Motta ELA, Serafini PC. Should the gynecologist perform laparoscopic bowel resection to treat endometriosis? Results over 7 years in 168 patients. *J Minim Invasive Gynecol.* 2009;16(4):472-9.
 52. Redwine DB, Wright JT. Laparoscopic treatment of complete obliteration of the cul-de-sac associated with endometriosis: long-term follow-up of en bloc resection. *Fertil Steril.* 2001;76(2):358-65.
 53. Landi S, Ceccaroni M, Perutelli A, Allodi C, Barbieri F, Fiaccavento A, et al. Laparoscopic nerve-sparing complete excision of deep endometriosis: is it feasible? *Hum Reprod.* 2006;21(3):774-81.

54. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
55. Kolte AM, Bernardi LA, Christiansen OB, Quenby S, Farquharson RG, Goddijn M, et al. Terminology for pregnancy loss prior to viability: a consensus statement from the ESHRE early pregnancy special interest group. *Hum Reprod*. 2015;30(3):495-8.
56. American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997;67(5):817-21.
57. Dunselman GAJ, Vermeulen N, Becker C, Calhaz-Jorge C, D'Hooghe T, De Bie B, et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2014;29(3):400-12.
58. Johnson NP, Hummelshoj L. Consensus on current management of endometriosis. *Hum Reprod*. 2013;28(6):1552-68.
59. Opøien HK, Fedorcsak P, Byholm T, Tanbo T. Complete surgical removal of minimal and mild endometriosis improves outcome of subsequent IVF/ICSI treatment. *Reprod Biomed Online*. 2011;23(3):389-95.
60. Koninckx PR. Biases in the endometriosis literature. Illustrated by 20 years of endometriosis research in Leuven. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1998;81(2):259-71.
61. Abrao MS, Gonçalves MO da C, Dias JA, Podgaec S, Chamie LP, Blasbalg R. Comparison between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis. *Hum Reprod*. 2007;22(12):3092-7.

-
62. Rekker K, Saare M, Roost AM, Salumets A, Peters M. Circulating microRNA Profile throughout the menstrual cycle. *PLoS One*. 2013; 8(11):e81166.
 63. Kuokkanen S, Chen B, Ojalvo L, Benard L, Santoro N, Pollard JW. Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biol Reprod*. 2010;82(4):791-801.
 64. Cochrane DR, Cittelly DM, Richer JK. Steroid receptors and microRNAs: relationships revealed. *Steroids*. 2011;76(1-2):1-10.
 65. Spizzo R, Nicoloso MS, Lupini L, Lu Y, Fogarty J, Rossi S, et al. miR-145 participates with TP53 in a death-promoting regulatory loop and targets estrogen receptor-alpha in human breast cancer cells. *Cell Death Differ*. 2010;17(2):246-54.
 66. Ramón LA, Braza-Boïls A, Gilabert-Estellés J, Gilabert J, España F, Chirivella M, Estellés A. microRNAs expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors. *Hum Reprod*. 2011;26(5):1082-90.
 67. MiRBase. MiRBase. [cited 2012 May 20]. Available from: http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000077
 68. Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA. MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):293-302.
 69. Jia S-Z, Yang Y, Lang J, Sun P, Leng J. Plasma miR-17-5p, miR-20a and miR-22 are down-regulated in women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2013;28(2):322-30.

-
70. MiRBase. MiRBase. [cited 2012 May 20]. Available from:
http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0001729
 71. Nothnick WB, Graham A, Holbert J, Weiss MJ. miR-451 deficiency is associated with altered endometrial fibrinogen alpha chain expression and reduced endometriotic implant establishment in an experimental mouse model. *PLoS One*. 2014;9(6):e100336.
 72. Hawkins SM, Creighton CJ, Han DY, Zariff A, Anderson ML, Gunaratne PH, Matzuk MM. Functional microRNA involved in endometriosis. *Mol Endocrinol*. 2011;25(5):821-32.
 73. MiRBase. MiRBase. [cited 2016 Mar 1]. Available from:
http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000735
 74. NCBI. MIR29C microRNA 29c [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. [cited 2016 Mar 14]. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/407026>
 75. Ohlsson Teague EMC, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson SA, Print CG, Hull LM. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol*. 2009;23(2):265-75.
 76. Ruan Y, Qian W, Zhang C, Zhou L, Hou Z. [Study on microRNA expression in endometrium of luteal phase and its relationship with infertility of endometriosis]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2013; 48(12):907-10.
 77. Long M, Wan X, La X, Gong X, Cai X. miR-29c is downregulated in the ectopic endometrium and exerts its effects on endometrial cell proliferation, apoptosis and invasion by targeting c-Jun. *Int J Mol Med*. 2015;35(4):1119-25.

78. NCBI. FKBP4 FK506 binding protein 4 [Homo sapiens (human)]. [cited 2016 Mar 1]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2288>