

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LUANA GOMES VELOSO WATANABE

Efeito da administração uterina de CXCL12 (SDF-1), sobre genes reguladores da expressão dos receptores de progesterona sobre o endométrio de camundongos fêmeas com endometriose induzida

Ribeirão Preto

2023

LUANA GOMES VELOSO WATANABE

Efeito da administração uterina de CXCL12 (SDF-1), sobre genes reguladores da expressão dos receptores de progesterona sobre o endométrio de camundongos fêmeas com endometriose induzida.

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva.

Ribeirão Preto
2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Watanabe, Luana Gomes Veloso

Efeito da administração uterina de CXCL12 (SDF-1), sobre genes reguladores da expressão dos receptores de progesterona sobre o endométrio de camundongos fêmeas com endometriose induzida/ Luana Gomes Veloso Watanabe. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva. 2023. 52p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, opção Biologia da reprodução - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Orientadora: Silva, Ana

Versão corrigida.

1. endometriose; 2- expressão gênica; 3- perfil de expressão; 4- modelo experimental; 5-cxcl12

WATANABE, L.G.V. Efeito da administração uterina de CXCL12 (SDF-1), sobre genes reguladores da expressão dos receptores de progesterona sobre o endométrio de camundongos fêmeas com endometriose induzida. 2023. 52p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora por ter permitido desenvolver meu projeto em uma área tão estimada.

Agradeço a Prof^a Ana Carolina por ter me orientado, amparado, ensinado e também por ter sido empática em muitas circunstâncias.

À minha mãe que sempre foi um exemplo de mulher batalhadora, me incentivando nos estudos, se abdicando de muitas coisas para me proporcionar o melhor. Agradeço a minha rede de apoio (sogra, tios e tias), sem eles não seria possível ter concluído essa etapa tão importante na minha vida.

Ao meu marido que sempre me apoiou, me aconselhou e esteve ao meu lado a todo momento, dividindo todas as tarefas do nosso lar.

Agradeço aos meus filhos, Benício e Lorena, que vieram e transformaram a minha vida. Me fizeram ser uma pessoa melhor e me motivaram a batalhar todos os dias. Mesmo não tendo idade para compreender as minhas responsabilidades e dificuldades, me acalentaram com muito carinho nessa caminhada. É por vocês essa conquista.

Aos profissionais que me ensinaram técnicas, me acolheram e compartilharam de suas experiências.

Agradeço aos colegas da Pós Graduação pela convivência e apoio mútuos.

“O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil”

RESUMO

WATANABE, L.G.V. Efeito da administração uterina de CXCL12 (SDF-1), sobre genes reguladores da expressão dos receptores de progesterona sobre o endométrio de camundongos fêmeas com endometriose induzida. 2023. 52p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023.

INTRODUÇÃO: Tendo em vista que a progesterona é indispensável no preparo endometrial pré-implantação, este assunto é cada vez mais relevante quando se estuda o comprometimento de fatores reprodutivos. A endometriose é uma desordem ginecológica cuja infertilidade é um dos seus sintomas. As hipóteses que comprovam tal associação permanecem controversas, mas acredita-se que seja consequência do comprometimento desses fatores, já que estudos recentes mostram que há uma redução na expressão dos receptores de progesterona no endométrio de mulheres portadoras dessa doença, afetando negativamente as taxas de implantação em ciclos de reprodução assistida. No presente trabalho utilizamos o *CXCL12* (substância com propriedade quimiotática de células tronco), que em estudo anterior do nosso grupo promoveu um aumento dos receptores de progesterona, melhorando assim as taxas de gestação no grupo de animais com endometriose induzida tratado com a quimiocina. **OBJETIVO:** este estudo propôs investigar o mecanismo pelo qual o tratamento com o *CXCL12* promoveu o aumento dos receptores de progesterona. **MATERIAL E MÉTODOS:** Para isso foram utilizados 32 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J, em metade dos animais foi realizada a indução de endometriose peritoneal e na outra metade foi realizado um procedimento sham. Cada grupo foi subdividido para receber *CXCL12* ou placebo. Os animais foram então colocados para acasalamento para verificar fertilidade e após o nascimento, submetidos a histerectomia. O tecido uterino foi então analisado quanto à expressão dos genes para o receptor de progesterona, do *CXCL12* e de seu receptor *CXCR4*, além de coativadores do receptor de progesterona (*SRC-1*, *SRC-2* e *SRC-3*). **RESULTADOS:** Com relação às taxas de gestações com nascimento, embora não tenha havido uma diferença estatística houve um aumento de 37,5% para 62,5% entre os animais com endometriose que receberam placebo ou *CXCL12*, o que consideramos clinicamente relevante. Na análise molecular verificamos semelhança na expressão do *PGR*, *CXCL12*, *CXCR4* e *SRC-1*, *SRC-2* e *SRC-3* entre os grupos sham e endometriose-placebo, porém ao tratar com *CXCL-12* houve redução na expressão de todos os genes estudados. Ao analisar a correlação entre os genes, encontramos uma forte correlação entre todos os genes selecionados aos se considerar todos os grupos juntos ou mesmo dentro de cada grupo separadamente, porém houve perda das correlações do *PGR* com todos os outros genes no grupo endometriose-CX. **CONCLUSÃO:** Nossos achados apresentam grande impacto supressor do *CXCL12* sobre a expressão de genes estudados ligados às vias da progesterona, sugerindo que a melhora das taxas de gestação não ocorra por ação direta na expressão do *PGR* ou dos coativadores estudados.

Palavras-chaves: endometriose, infertilidade, progesterona, CXCL12, coativadores.

ABSTRACT

WATANABE, L.G.V. Effect of uterine administration of CXCL12 (SDF-1) on genes that regulate the expression of progesterone receptors on the endometrium of female mice with induced endometriosis. 2023. 52p. Masters dissertation – Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo, 2023.

INTRODUCTION: Considering that progesterone is essential in pre-implantation endometrial preparation, this issue is increasingly relevant when studying the impairment of reproductive factors. Endometriosis is a gynecological disorder whose infertility is one of its symptoms. The hypotheses that prove this association remain controversial, but it is believed to be a consequence of the impairment of these factors, since recent studies show that there is a reduction in the expression of progesterone receptors in the endometrium of women with this disease, negatively affecting rates implantation in assisted reproduction cycles. In the present work, we used CXCL12 (chemokine substance with chemotactic property of stem cells), used in a previous study of our group where an increase in progesterone receptors occurred, thus improving pregnancy rates in the group of animals with induced endometriosis treated with the chemokine. **OBJECTIVE:** The aim of our study was to identify to investigate the mechanism by which treatment with CXCL12 promoted an increase in progesterone receptors. **MATERIAL AND METHODS:** For this, 32 female mice of the C57BL/6J strain were used, in half of the animals peritoneal endometriosis induction was performed and in the other half a sham procedure was performed. Each group was subdivided to receive CXCL12 or placebo. The animals were then placed for mating to check for fertility and after birth, underwent hysterectomy. The uterine tissue was then analyzed for the expression of genes for the progesterone receptor, CXCL12 and its receptor CXCR4, in addition to We selected some progesterone receptor coactivators (SRC-1, SRC-2 and SRC-3) that are related with progesterone to verify if there was also a relationship between them and this chemokine and if such a relationship could have contributed to this outcome. **RESULTS:** Regarding the rates of pregnancies with birth, although there was no statistical difference in our findings, there was an increase from XXX 37.5% to XXX 62.5% among animals with endometriosis that received placebo or CXCL12, which we consider clinically relevant. . there was an increase in pregnancy rates in the endometriosis group treated with CXCL12. In the molecular analysis, we found a similarity in the expression of PGR, CXCL12, CXCR4 and SRC-1, SRC-2 and SRC-3 between the sham and endometriosis-placebo groups, but when treating with CXCL-12 there was a reduction in the expression of all genes studied . When analyzing the correlation between genes, we found a strong correlation between all selected genes when considering all groups together or even within each group separately, but also a difference in the expression of CXCL12 in the Endometriosis group treated with this chemokine, having There was a loss of PGR correlations with all other genes in the latter in the endometriosis-CX group. **CONCLUSION:** Our findings show a great suppressive impact of CXCL12 on the expression of studied genes linked to progesterone pathways, thus suggesting a role of this chemotactic agent in which the improvement in pregnancy rates and increase in the expression of progesterone receptors in the endometrium does not occur by direct action on the endometrium. expression of PGR or coactivators studied.

Keywords: endometriosis, infertility, progesterone, CXCL12, coactivators.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO REVISÃO DE LITERATURA	9
Endometriose.....	9
Endometriose e Infertilidade.....	11
O quimiotático SDF-1 (CXCL12) e sua relação com a endometriose	12
Regeneração endometrial: relação entre células-tronco, progesterona e do quimiotático SDF-1 (CXCL12)	14
A receptividade endometrial na endometriose está comprometida?.....	15
Coativadores de receptores de esteroides	18
OBJETIVOS	22
Objetivo Primário	22
Objetivo Secundário.....	22
MATERIAIS E MÉTODOS	22
RESULTADOS	30
DISCUSSÃO	37
CONCLUSÃO.....	41

REVISÃO DE LITERATURA

Endometriose

A endometriose é caracterizada pelo crescimento do endométrio fora da cavidade uterina, resultando no estabelecimento de lesões endometrióticas que podem ser encontradas na superfície dos órgãos da cavidade pélvica, dos ovários e eventualmente em órgãos extra-pélvicos (Sharif, Hanyia et al. 2014).

A patogênese da doença é multifatorial e existem diversas hipóteses na literatura sobre sua etiologia, sendo a teoria da menstruação retrógrada, proposta por Sampson, a explicação mais aceita. (Halme, Hulka et al. 1984). Lesões endometrióticas também foram localizadas em locais extrapélvicos, em mulheres que fizeram histerectomia e também em homens. Apontando para outras vertentes no desenvolvimento da doença, não se limitando apenas à teoria de Sampson. (Taylor et al., 2021) (Figura 1).

Em relação ao quadro clínico, apesar de haver casos assintomáticos, os seus sintomas, quando presentes, incluem: dismenorria, dor pélvica, dispareunia e a infertilidade, a qual está presente em 10 a 15% das mulheres em idade reprodutiva (Andres et al., 2020; Nácúl & Spritzer, 2010).

Aproximadamente mais de 176 milhões de mulheres são portadoras de endometriose, embora seja alta sua prevalência, o diagnóstico costuma ser tardio. Para esse, estima-se que demore em torno de 4 a 11 anos. Todo esse atraso está relacionado a diagnósticos incorretos, visto que a maioria das mulheres relatam que os sintomas apresentados são considerados inadequadamente normais (Taylor et al., 2021).

Além da dificuldade de diagnóstico pela inespecificidade dos sintomas, na prática clínica o diagnóstico definitivo para endometriose é feito através da laparoscopia, sendo

esse mais um obstáculo para que se obtenha um diagnóstico precoce (Ozkan et al., 2008; Taylor et al., 2021) .

Sendo a endometriose uma doença estrogênio-dependente, o tratamento se baseia no controle da doença utilizando fármacos que promovam o hipoestrogenismo, como os análogos do GnRH, ou que antagonizem o efeito endometrial do estrogênio, como por exemplo o uso de progestagênios. É importante também que seja um tratamento individualizado, de forma que leve em consideração os sintomas da paciente e o impacto da doença e de seu tratamento sobre a sua qualidade de vida (Cesar Rosa Silva et al., 2021). A mediação desses fármacos promove a menor atividade dos focos de endométrio ectópico, diminuindo o processo inflamatório e consequentemente amenizando as dores associadas a doença (Crosignani, Bergqvist et al. 2006; Cesar Rosa Silva et al., 2021). A opção cirúrgica é considerada em pacientes que relatam dor refratária ao tratamento clínico, lesões profundas com acometimento de órgãos adjacentes e excepcionalmente em casos de infertilidade, uma vez que nestes casos a reprodução assistida é o tratamento de escolha para estas mulheres (Arafah et al., 2021; Cesar Rosa Silva et al., 2021).

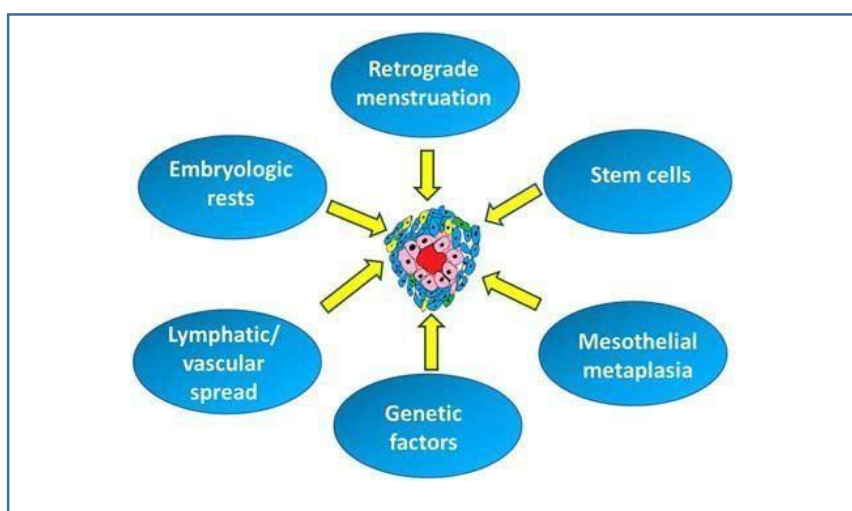


Figura 1. Diversas teorias sobre a etiologia da endometriose. Extraído de: Arafah, M., Rashid, S., & Akhtar, M. (2021). Endometriosis: A Comprehensive Review. *Advances in Anatomic Pathology*, 28(1), 30–43. <https://doi.org/10.1097/PAP.000000000000288>

Endometriose e Infertilidade

Apesar dessa patologia estar relacionada a infertilidade ou baixa fecundidade, as hipóteses que comprovam tal associação permanecem controversas (Taylor et al., 2021; Kuroda, Kitade et al. 2009; Mahmood, Arumugam et al. 1991). A inflamação crônica, consequência de tal patologia, pode afetar negativamente a função endometrial, onde foi demonstrado que o endométrio eutópico de mulheres com endometriose passa por alterações relacionadas as células inflamatórias e imunológicas, afetando assim a receptividade endometrial e contribuindo ao desenvolvimento da resistência a progesterona (Arafah et al., 2021; Taylor et al., 2021).

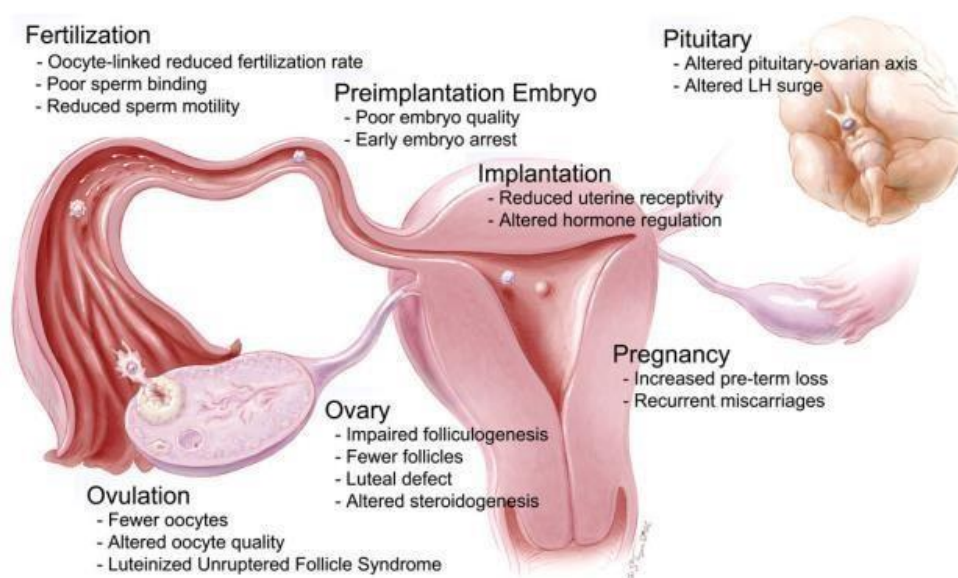


Figure 2. Fatores associados à redução da fertilidade em mulheres portadoras de endometriose.

Extraído de: Stille JA, Birt JA, Sharpe-Timms KL. Cellular and molecular basis for endometriosis-associated infertility. *Cell Tissue Res.* 2012 Sep;349(3):849-62.

Outros fatores, com menor evidência na literatura, também tem sido relacionados a um comprometimento da função reprodutiva destas mulheres. A foliculogênese, por exemplo, e seus mecanismos regulatórios é um destes fatores. Parecer haver uma disfunção que altera as vias de feedback da hipófise, comprometendo o pico de LH

responsável pela ovulação. (Cahill, Wardle et al. 1995). Além disso, essa redução do LH parece levar a um menor número de folículos pré-ovulatórios maduros (Doody et al. 1988; Cahill et al. 1995; Dlugi et al. 1989). Logo após a ovulação, há um processo de diferenciação das células tecais e granulosas em células luteais, a partir dessa diferenciação inicia-se o processo de produção da progesterona, cujo objetivo é o preparo do endométrio para a nidação (Kumar, 1998); em mulheres com endometriose a morfologia das células luteais encontra-se alterada (presença de células luteais grandes e pequenas) com consequente produção deficiente de progesterona (Cheesman et al., 1983; Cunha-Filho et al., 2003).

Sendo o papel da progesterona fundamental para a adequada receptividade endometrial para implantação, pode-se entender a menor taxa de implantação descrita por alguns autores em mulheres com endometriose. (Stilley et al., 2012)

O quimiotático SDF-1 (CXCL12) e sua relação com a endometriose

As quimiocinas constituem uma ampla família de pequenas citocinas e são conhecidas pelas suas características pró-inflamatórias e também pela sua função quimiotática, que permite o controle da migração celular durante o desenvolvimento ou manutenção de algum tecido (Palomino & Marti, 2015).

O *CXCL12* (também conhecido como fator 1 derivado do estroma [SDF-1]) tem como receptor o *CXCR4*, e juntos possuem ação parácrina no câncer, favorecendo para o crescimento e desenvolvimento do tumor através do seu papel no controle da angiogênese, invasão e metástase, proliferação e crescimento celular. (Palomino & Marti, 2015; Zlotnik et al., 2006; Vandercappellen et al. 2008).

O ligante e o seu receptor são essenciais nos processos reprodutivos, desempenhando funções desde a implantação, placentação e embriogênese. Na

placentação, por exemplo, o eixo *CXCL12-CXCR4* é responsável pela interação entre o trofoblasto e o endométrio receptivo. Dado o *CXCL12* como um biomarcador de receptividade endometrial, em um recente estudo, a exposição ao tabaco diminuiu significativamente essa quimiocina, tendo como consequência uma receptividade endometrial prejudicada em mulheres que fumavam. Por outro lado, visto que essa quimiocina também está implicada na patogênese da endometriose, mulheres que faziam o uso de tabaco possuíam um efeito protetor em relação a doenças proliferativas (Wang et al. 2015; Sahin Ersoy et al., 2017).

Ainda sobre desfechos reprodutivos, o *CXCL12* está implicado no que diz respeito a boa qualidade de embriões e isso é devido a sua função antiapoptótica. Segundo o estudo de Kryczek et.al, foi demonstrado que as células da granulosa de folículos pré ovulatórios humanos produzem o *CXCL12* e esse é responsável pelo recrutamento de leucócitos e juntos controlam a sobrevivência das células da granulosa por meio do controle da apoptose. Tudo isso implica em uma melhora na qualidade embrionária, dado que alguns autores advertem que o processo de apoptose das células da granulosa prejudica as taxas de gravidez. Sendo assim a ação antiapoptótica do *CXCL12* juntamente aos linfócitos, contribuem para um embrião de melhor qualidade (Kryczek et al., 2005).

Na endometriose ocorre a produção de quimiocinas e o *CXCL12* é uma dessas, sendo responsável pela mobilização e o homing de células-tronco advindas da medula óssea (BMDSCs) para o endométrio (Moridi et al., 2017). Em mulheres portadoras da doença essa sinalização encontra-se elevada e possui um fator determinante na migração dessas células para as lesões (Moridi et al., 2017; Pluchino et al., 2020). Nesses casos, as células-tronco derivadas da medula óssea (BMDSCs) estão implicadas no que se refere a patogênese da doença, contribuindo assim para o desenvolvimento das lesões de endometriose. Em um estudo realizado utilizando um antagonista de *CXCR4* (receptor de

CXCL12), observou-se que o bloqueio do eixo *CXCL12/CXCR4* resultou em uma redução significativa no enxerto das BMDSCs na endometriose, confirmando o papel das células-tronco no desenvolvimento da doença. Além disso, o tratamento com o antagonista *CXCR7* e AMD3100 (Plerixafor) diminuiu o tamanho das lesões (Pluchino et al., 2020).

As justificativas para o aumento da produção do *CXCL12* e o recrutamento de células-tronco na endometriose, podem ser baseadas em diversos mecanismos, sendo um deles a sinalização aberrante ao estrogênio e a resistência à progesterona, que também atua no eixo *CXCL12-CXCR4* (Petit et al., 2007; Glace et al., 2009; Wang et al., 2015).

Regeneração endometrial: relação entre células-tronco, progesterona e o quimiotático (CXCL12)

O endométrio é constituído por duas camadas, classificadas como camada funcional e camada basal. É na camada basal que o processo de crescimento e diferenciação de diversas células ocorre. Durante a menstruação há descamação da camada funcional e sua regeneração ocorrerá a partir da camada basal (Padykula et al. 1984; Padykula, 1991; Spencer et al. 2005; Jabbour et al. 2006; Chan et al. 2004). Essa regeneração permitirá o desenvolvimento de um novo epitélio, propício para uma futura nidificação ou, caso essa não ocorra, haverá nova descamação do endométrio (menstruação). A regeneração e remodelação endometrial sofrem influência de hormônios, sendo que o estrogênio é responsável pela proliferação epitelial e estromal, e a progesterona pela decidualização (Du and Taylor, 2012; Masuda et al., 2007).

Para elucidar a questão sobre o papel da célula-tronco na regeneração cíclica do endométrio, foi demonstrado que situações em que ocorreu uma isquemia ou trauma uterino, as taxas de migração destas células-tronco foram dobradas, enfatizando sua função na reparação da lesão endometrial quando comparada a uma regeneração cíclica

(Du and Taylor, 2012; Zhou, Gan et al. 2011). Sabendo que a função das células-tronco contribui de maneira significativa para a homeostase tecidual, em doenças ginecológicas pode haver o comprometimento dessa função em relação a uma proliferação endometrial anormal. Com isso, foram pautadas relações entre células-tronco e a Endometriose (Gargett, Schwab et al. 2015).

Estudos anteriores mostraram que as lesões endometrióticas interferem no recrutamento de células-tronco, por isso o entendimento dos mecanismos específicos que regulam esse tráfico torna-se importante. Foi demonstrado que o eixo *CXCL12-CXCR4* tem papel fundamental nesta regulação de células-tronco para o endométrio (Wang, et al. 2015). Como mencionado anteriormente, a citocina *CXCL12* tem sido investigada no que diz respeito a sua ação em lesões da endometriose. Foi observado um aumento tanto da sua expressão quanto a do seu receptor *CXCR4* no endométrio de pacientes portadores de endometriose (Leconte et al. 2014; Van et al. 2013).

A migração das células-tronco para um local distante do útero pode afetar negativamente a receptividade. Terapias que visam o restabelecimento do fluxo de células-tronco para o útero e melhora na regeneração endometrial, poderiam contribuir para o sucesso da implantação (Sharif, Hanyia et al, 2014).

A receptividade endometrial na endometriose está comprometida?

Como mostrado anteriormente, a porcentagem de mulheres portadoras de endometriose que são inférteis é alta. No que se refere a receptividade endometrial, embora ainda controverso, vários estudos demonstram que a endometriose está relacionada a diversas alterações, comprometendo a fertilidade. (Lessey & Kim, 2017).

O processo de implantação é complexo e depende de vários fatores, sendo assim, para que esse seja bem sucedido é necessário uma combinação entre um embrião saudável e um endométrio receptivo. A receptividade endometrial corresponde a um período delimitado, no qual por influência hormonal o endométrio se transforma em um estado funcional transitório para que possa ocorrer a implantação do blastocisto e assim resultar no início de uma gravidez (Lessey & Kim, 2017; Neykova et al., 2020). Quanto a produção hormonal, há uma predominância da atividade da progesterona em relação ao estrogênio. Em mulheres com endometriose as ações desempenhadas pela progesterona encontram-se reduzidas, afetando negativamente na receptividade endometrial (Stilley et al., 2012).

Já foi descrito por alguns autores maiores taxas de falha de implantação (Tomassetti et al, 2006), aborto recorrente e aumento das perdas de gestações tardias em mulheres com endometriose em relação a mulheres sem a doença (Yanushpolsky et al, 1998).

A decidualização é mediada pela ação da progesterona, cujo processo ocorre durante a janela de implantação e é caracterizada pela produção de substâncias que incluem: fatores de crescimento, componentes da matriz celular e citocinas. Essas substâncias serão responsáveis pelo controle da invasão trofoblástica, redução da resposta imune materna e resistência a insultos inflamatórios (Gurpide, Tabanelli et al. 1992; Dimitriadis Jones et al. 2005).

É sabido que o sucesso de uma implantação depende diretamente da receptividade uterina, e essa está relacionada a processos que envolvem uma regulação hormonal de moléculas de adesão e também citocinas. Podemos avaliar a receptividade uterina através de integrinas, principalmente a integrina $\alpha V\beta 3$. Em pacientes com endometriose, a integrina $\alpha V\beta 3$ encontra-se diminuída ou ausente (Aghajanova and

Giudice 2008; Donaghay e Lessey 2007). Em modelo animal de endometriose induzida também foi demonstrada menor expressão de receptores de integrina no endométrio, associado à uma menor expressão de receptores de progesterona e menor taxa de gestação e nascimento (Rosa-e-Silva et al, 2022). Uma explicação para essa deficiência da $\alpha V\beta 3$, está no desequilíbrio da função do HOXA 10, fator de transcrição responsável pela estimulação da integrina (Eun and Taylor 2004).

Juntamente com o receptor PR (receptor de progesterona), está presente também o receptor de estrogênio ESR1, que será regulado negativamente pela progesterona. A persistência desses receptores no epitélio glandular está relacionada com a resistência a progesterona e como resultado pode causar um quadro de infertilidade devido à defeitos na implantação. Essa resistência à progesterona tem sido correlacionada a fatores inflamatórios presentes no endométrio (Lessey et al., 2017; Marquardt et al., 2019; Li et al., 2013).

Em um estudo recente desenvolvido por nosso grupo (Rosa e Silva et.al, 2022) o uso de *CXCL-12* injetado diretamente no útero de camundongos com endometriose aumentou as taxas de gestação, e este aumento correlacionou-se com a recuperação da expressão imunohistoquímica de receptores de progesterona e de integrina $\alpha V\beta 3$ no endométrio. Parece haver uma influência desta substância na expressão destes marcadores de receptividade endometrial, que estão inicialmente reduzidos em camundongos com endometriose (Rosa e Silva et.al, 2022). A redução na expressão de integrinas também foi observada por outros autores que responsabilizaram a inflamação da doença por esta queda, o que levaria a menor capacidade de adesão do embrião na matriz extracelular, o que justificaria uma implantação deficiente (Lessey, Castelbaum et al. 1996; Meyer et al., 1997).

Através de alguns mecanismos responsáveis pela indução e expressão gênica, uma transformação ocorre na janela de implantação, alterando assim os fatores endócrinos, mediado pela progesterona, para fatores parácrinos e autócrinos. Resumidamente, as ações diretas da progesterona tornam-se ações indiretas. Defeitos nessa mudança estariam associados a infertilidade, afetando negativamente a implantação (Large, Demayo et al. 2012; Lessey 2003; Li, Large et al. 2013).

Coativadores de receptores de esteroides

Os *SRC* desempenham funções de coativadores de receptores de esteroides e são composto por uma família de três membros: *SRC-1 (NCOA-1)*, *SRC-2 (NCOA-2)* e *SRC-3 (NCOA-3)*. Todos os três demonstram interação com o domínio de ligação da progesterona, sendo essa interação do tipo dependente do ligante (Mukherjee et al., 2006; Szwarc et al., 2015).

Eles podem modular a atividade de outros fatores de transcrição, porém a regulação da ação do hormônio de esteroide ainda é a principal. Com isso, os coativadores tornaram-se alvo de estudo no que se refere a regulação da biologia reprodutiva, sendo eles críticos no trato reprodutivo feminino, nesse caso, desde a ovulação, implantação e parto (Szwarc et al., 2015).

Em estudos *in vitro* foi constatado que a transcrição mediada pela progesterona depende da relação com os membros de coativadores de receptores de esteroides. Com base nisso, foi pressuposto que tal interação teria como intuito recrutar um ou mais membros do *SRC* para um subconjunto de genes alvo da progesterona, onde tal transcrição apresentaria uma resposta fisiológica particular à exposição a progesterona (Mukherjee et al., 2006).

Através de estudos com modelos de camundongos KO para cada um dos membros de coativadores, determinou-se o papel de coativador dos membros SRC em processos fisiológicos mediados pela progesterona. Os resultados demonstraram que o modelo *SRC-1* KO teve sua resposta decidual prejudicada, corroborando para a importância da função desse coativador no processo de remodelação de tecido, que é dependente da sinalização de progesterona. No caso do modelo *SRC-3* KO ele está presente em modificações mamária, que também são mediadas pela progesterona. Já o *SRC-2* KO foi implicado como um coativador essencial aos processos de transcrição mediados pela progesterona no que se refere a manutenção da fecundidade feminina. Nesse estudo, o modelo *SRC-2* KO apresentou infertilidade e falhas de implantação, presumindo que para que ocorra uma resposta decidual completa, é necessário que a transcrição mediada pela progesterona envolva também do coativador SRC-2. Tal estudo ressaltou que esse coativador é indispensável nas respostas uterinas dependentes de progesterona que determinam o processo de implantação embrionária (Mukherjee et al., 2006).

Todos os membros da família SRC podem ter uma relação direta com a progesterona e os seus diferentes subtipos podem ativar genes específicos. Portanto o recrutamento diferencial dos membros de SRC corresponde à um modo importante pela qual a progesterona medeia seus efeitos diferentemente. A conclusão do estudo citado anteriormente foi a de que *SRC-2* junto à progesterona desempenham funções proliferativas em relação a função uterina (Mukherjee et al., 2006), sendo o endométrio um dos tecidos mais estudados em relação a ação desses coativadores (Szwarc et al., 2015), uma vez que a decidualização depende da ação dos esteróides sexuais (Szwarc et al., 2015).

A ação dos coativadores também está relacionada à inúmeras anormalidades do tecido reprodutivo, incluindo a endometriose. Os achados de alguns estudos relatam uma nova isoforma de *SRC-1*, também referida como *SRC-1* truncada de 70 kDa; essa proteína poderia bloquear a apoptose, favorecendo a sobrevivência das células em lesões endometrióticas (Mukherjee et al., 2006; Han et al., 2012; Szwarc et al., 2015)

No caso da endometriose, as *SRC-1* de comprimento total as lesões de endometriose apresentam baixas concentrações quando comparadas ao endométrio eutópico. Já a nova isoforma do *SRC-1* está aumentada em células estromais endometrióticas, em comparação com as lesões ectópicas e na correlação com a progressão da doença foi constatada uma elevação no processamento de *SRC-1* (Han et al., 2012).

No tecido endometriótico de camundongos com endometriose induzida também foram descritas alterações nas formas *SRC-2* e *SRC-3*, ainda assim as formas truncadas de *SRC-2* e *SRC-3* ficaram restritas apenas às lesões ectópicas (Han et al., 2012). Em estudo de Wang et al., foi verificada uma expressão maior do coativador *SRC-1* no endométrio ectópico na fase secretora e isso acompanhou o aumento também da quimiocina *CXCL12*. A fim de estudar os papéis dos coativadores, notou-se que ao silenciar o gene *SRC-1* ocorreu uma diminuição da expressão do *CXCL12* que foi induzido pelo estrogênio. Também se verificou que o coativador *SRC-2* é necessário para que a progesterona faça a inibição do *CXCL12* produzido pelo estrogênio. Concluiu-se que embora os coativadores *SRC-1* e *SRC-2* pertençam a mesma família, no que diz respeito a expressão do *CXCL12* eles diferem em suas funções, sendo que o primeiro é mais significativo para a expressão da quimiocina induzida pelo estrogênio e o *SRC-2* é fundamental para a atividade da progesterona em relação a inibir o *CXCL12* (Shi et al., 2014).

Como mencionado anteriormente, os SRC além de regularem os receptores de esteroides, também exercem funções em outros fatores de transcrição. Sendo assim eles possuem capacidade em modular várias vias, fazendo deles alvos para fins terapêuticos, seja para inibição ou ativação (Szwarc et al., 2015).

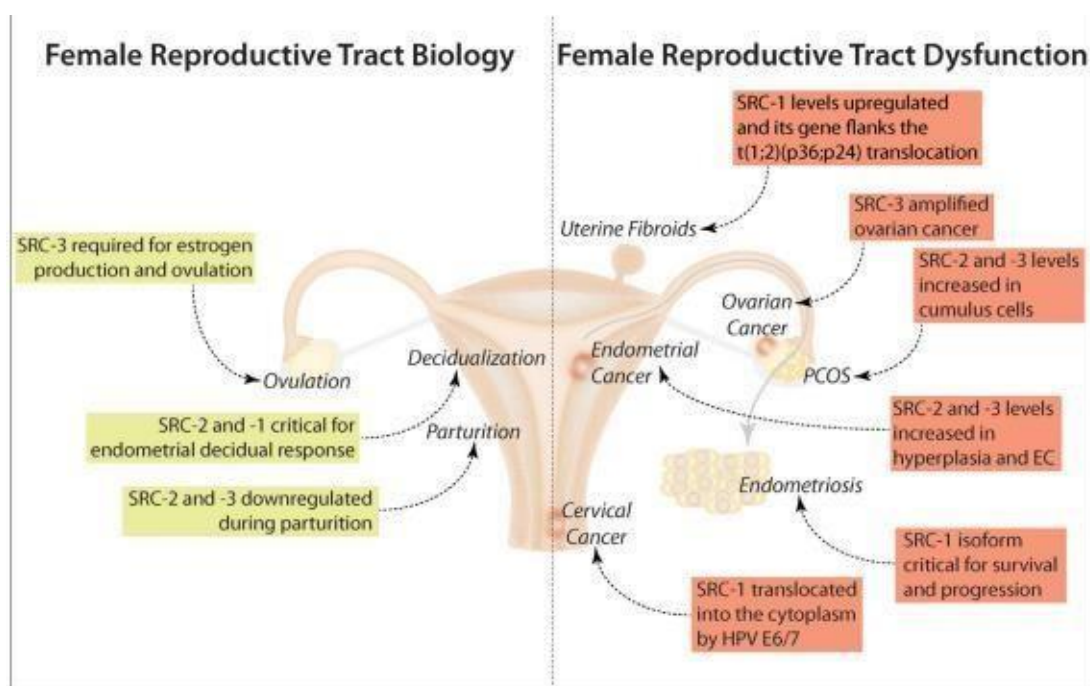


Figura 3: Funções dos coativadores na biologia reprodutiva a nível fisiológico e patológico. Szwarc, M. M., Lydon, J. P., & O'Malley, B. W. (2015). Steroid receptor coactivators as therapeutic targets in the female reproductive system. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 154, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.010>

O estudo anterior do grupo que demonstrou um efeito positivo da aplicação uterina de *CXCL-12* nas taxas de gestação e nascimento em camundongos fêmea com endometriose induzida, acompanhado da recuperação na expressão dos receptores de progesterona no endométrio nos levou a questionar qual seria o mecanismo pelo qual o *CXCL12* teria levado a este efeito (Rosa e Silva et, 2022). Inicialmente desenhado para atrair células tronco mesenquimais da medula óssea (BMDSCs) e promover melhora das taxas de implantação neste modelo, obtivemos sim a melhora na implantação, mas não identificamos um efeito mediado pelas BMDSCs, o que nos levou a considerar a

possibilidade de um efeito direto do *CXCL12* sobre estes marcadores. Sendo assim, este estudo foi desenhado com a finalidade de explorar algumas das vias relacionadas à expressão dos receptores de progesterona e o efeito do *CXCL12* sobre elas.

OBJETIVOS

Objetivo Primário

Avaliar o impacto da administração de *CXCL12* no útero de camundongos fêmeas com endometriose induzida nas vias envolvidas na expressão de receptores de progesterona no endométrio e nas taxas de gravidez.

Objetivo Secundário

Avaliar o impacto da administração de *CXCL12* no útero de camundongos fêmeas com endometriose induzida nos desfechos reprodutivos: taxa de gestação, tempo para o nascimento e tamanho da ninhada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Desenho Experimental

O experimento foi realizado em camundongos selvagens C57BL/6J fêmeas. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Obstetrícia, Ginecologia e Ciência Reprodutivas da Escola de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), em gaiolas de 4 a 5 animais, em ambiente com 12 horas de ciclo claro/escuro (7:00 am–15 7:00 pm), com acesso à água e comida ad libitum. Todos os animais foram tratados seguindo os

protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) para os cuidados com animais.

Indução de endometriose cirúrgica:

Os animais foram divididos em dois grupos para serem submetidos ou não à indução cirúrgica de endometriose ou sham. Para a indução da endometriose foi realizada uma incisão laparotômica na linha média do abdome do animal, com xilasina (Lloyd Laboratories) e quetamina (Fort Dodge Animal Health) nos animais C57BL/6 (doses descritas em detalhes logo abaixo), as doadoras fêmeas foram utilizadas para retirada de todo o útero, o qual foi lavado em PBS e dividido em dois cornos. O lúmen de cada fragmento uterino foi aberto longitudinalmente e transversamente dividido em dois pedaços (com 5x5mm² cada um). Utilizando-se Vicryl 5-0, quatro fragmentos de endométrio (útero) foram suturados ao peritônio parietal dos camundongos fêmeas receptoras, simetricamente distribuídos na parede peritoneal. Como controle, a outra metade dos animais foi submetida ao procedimento sham, com 4 pontos de sutura peritoneal sem tecido endometrial, em cada animal.

O fechamento da parede abdominal das receptoras foi realizado em dois planos, utilizando-se Vicryl 4-0. No processo de analgesia dos animais pós-operatório utilizamos como droga analgésica o Meloxicam 0,2%, na dose de 5 mg/kg, via subcutânea, uma vez ao dia, por três dias consecutivos. A figura 4 ilustra o procedimento cirúrgico descrito e a figura 5 a formação das lesões.



Figura 4 – Representação dos fragmentos de endométrio suturados ao peritônio parietal.



Figura 5 – Lesões endometrióticas

Injeções uterinas de CXCL-12

Após 3 semanas dos procedimentos cirúrgicos tanto o grupo com endometriose quanto o grupo sham foram subdivididos para receber *CXCL12* (Recombinant Mouse SDF-1 α , Gemini-Bio®, West Sacraento- CA, USA) ou placebo através de injeções na parede uterina durante laparotomia (figura 6).

A dose de *CXCL-12* utilizada foi de 2,5mcg, diluídos em 150 μ l de água estéril com 0,1%BSA, injetados 75 μ l em cada corno uterino, utilizando-se seringa e agulha de

insulina. Nos grupos placebo foi utilizado o mesmo volume de água estéril com BSA 0,1%, sem o *CXCL-12*.

Após 2 semanas da administração de *CXCL12* ou placebo, os animais dos quatro grupos foram colocados para acasalamento por quatro semanas, após os quais foram avaliados os desfechos reprodutivos (taxas de gestação, tempo para o nascimento e tamanho da ninhada). Após o nascimento dos filhotes as fêmeas foram eutanasiadas e histerectomizadas, sendo os cornos fixados em RNA later para a avaliação da expressão gênica dos genes selecionados.



Figura 6 – Injeções na parede uterina durante laparotomia

Anestesia e Analgesia

A indução cirúrgica das lesões foi realizada após injeção intraperitoneal com quetamina associado a xilasina, sendo as doses de: 5-10mg/kg IP de xilasina (Lloyd Laboratories) e 90 - 120 mg/kg IP de quetamina (Fort Dodge Animal Health). Analgesia dos animais no pós-cirúrgico foi realizada com Meloxicam 0,2%, na dose de 5 mg/kg, via SC, uma vez ao dia, por 3 dias consecutivos, iniciado no pré-operatório.

Acasalamento

Após três semanas da injeção de CXCL12 ou placebo os animais dos quatro grupos: Endometriose + CXCL12, Endometriose + Placebo, Sham + CXCL12 e Sham + Placebo, foram colocados em gaiolas com machos férteis, por até quatro semana, sendo 3 a 4 fêmeas e 1 macho por gaiola, perfazendo um total de 8 machos (1 por grupo de estudo). Após 7 dias do início do período de acasalamento, as fêmeas foram pesadas em dias alternados para a identificação de gestação, um ganho maior ou igual 2g em 48 horas foi considerado sugestivo de gestação. A curva ascendente de peso por 6 dias consecutivos confirmou a gestação, quando então a fêmea foi retirado da gaiola coletiva e da presença do macho e colocada em uma gaiola separada até o nascimento. As fêmeas que não apresentaram sinais de gravidez após 4 semanas de acasalamento foram retiradas da presença do macho, e antes de considerá-la infértil, aguardamos um período de 7 dias para os casos de gestação iniciada nos últimos dias com o macho.

Determinação do ciclo estral, eutanásia e coleta do útero:

De 24 a 48 horas após o parto ou após os 7 dias separadas dos machos, as fêmeas foram recolocadas com o macho para um segundo acasalamento, com finalidade de desencadear a transformação endometrial para diestro. Consideramos a presença de plug vaginal após o coito como o dia 1 da gestação, no dia 4 foi colhida a citologia realizando-se flush vaginal com 10 microlitros de PBS injetados com pipeta, montados em lâmina e lamínula e visualizados em microscópio óptico. Confirmando o diestro (figura 7) foi realizada a eutanásia do animal seguida da histerectomia para armazenamento da amostra.

Os animais que se apresentaram em outra fase estral foram acompanhados no ciclo até a presença de diestro.

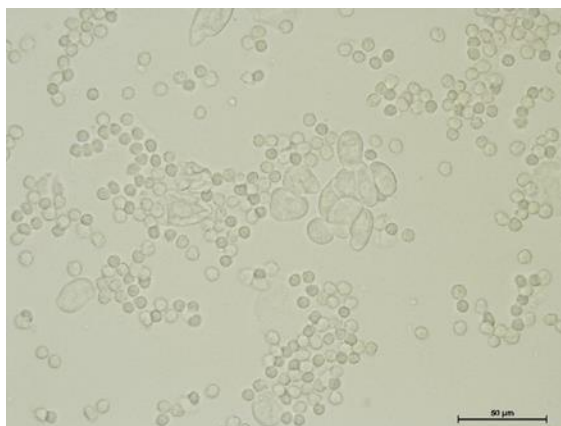


Figura 7 – Esfregaço vaginal para classificação estral. Diestro com predomínio de leucócitos.

Os animais foram eutanasiados utilizando-se administração, por via intraperitoneal de sobredosagem de quetamina 300mg /kg + xilazina 30mg/kg, após alguns minutos confirma-se a perda de consciência e morte. Em seguida foi feita abertura da parede abdominal, liberação dos cornos uterinos e remoção do útero. O material foi guardado em solução de RNA later e guardado em freezer a -80°C.

Seleção dos genes alvos coativadores de Receptores de esteroides

Inicialmente foi proposto realizar a avaliação da expressão dos genes *PGR* (receptor de progesterona), *CXCL12* e *CXCR4*, entretanto, buscávamos analisar também outros genes reguladores da expressão do receptor de progesterona no endométrio.

Os genes alvos *SRC-1*, *SRC-2* e *SRC-3* foram selecionados após busca na literatura por genes relacionados a partir da cascata de ativação e síntese dos receptores de esteroides. Além disso, a associação funcional e a integração da rede biológica para estes coativadores e para os genes *PGR*, *CXCR4* e *CXCL12* foram determinadas nos sites

GeneMANIA (Warde-Farley et al., 2010) (<https://genemania.org/>) e STRING database (v11.5 at a low confidence score (0.150) - (<https://version-11-5.string-db.org/cgi/network?networkId=bxS9AFSYn6mM>))

Extração do RNA total e síntese do cDNA

As amostras foram lavadas em solução de PBS (1x) (NaCl 8,50g/L; Na₂HPO₄ 1,11g/L; Na₂HPO₄.12H₂O 2,81g/L; KH₂PO₄ 0,20g/L pH7,0) e armazenadas em RNAlater® RNA Stabilization Solution (#AM7021, Ambion, Life Technologies, USA) a - 80°C. Após a retirada do RNA later, 50 mg de tecido foi macerado com o aparelho Polytron PT 1200E (Kinematica AG, Switzerland), seguido da extração do RNA total utilizando o PureLink RNA Mini Kit (#12183018A, Ambion, Thermo Fisher Scientific, USA) conforme orientações do fabricante. O RNA total foi tratado com Ambion DNA-free Kit (#AM1906, Invitrogen, USA) para a remoção de contaminação por DNA. As concentrações de RNA total foram determinadas no espectrofotômetro NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, USA). Um total de 99 ng RNA total foi transcrito reversamente utilizando o High Capacity cDNA Archive Kit (#4387406, Thermo Fisher Scientific, USA) segundo as orientações do fabricante. Posteriormente fizemos uma curva de eficiência a fim de encontrarmos a melhor diluição, chegando à conclusão de diluição 1:4 em água DPC.

Quantificação da expressão por PCR em tempo real (RT-qPCR)

A quantificação relativa (RQ) para os genes alvos foi realizada através do TaqMan® Gene Expression Assays (# 4331182, Applied Biosystems, USA): SRC-1 (#Mm01318933_m1), SRC-2(#Mm01226633_m1), SRC-3 (Mm00500775_m1), PGR

(#Mm00435628_m1), CXCR4 (#Mm01292123_m1) e CXCL12 (#Mm00445553_m1). Utilizamos para controle os genes endógenos GAPDH (#Mm99999915_g1) e PPIA (#Mm02342430_g1) baseado no estudo de Andrusiewicz et al., 2016. A quantificação da expressão foi determinada no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Warrington, UK). A reação foi preparada utilizando um volume de 5.0 µL de TaqMan Fast Advanced Master Mix (2X) (# 4444557, Applied Biosystems, USA), 0.5 µL of hydrolysis probe (20X) (# A25576, Applied Biosystems, USA), 4.5 µL of cDNA (diluição 1: 4), nuclease-free e água para completar o volume final de 10 µl. As amostras foram executadas em triplicatas com uma diferença máxima entre os valores de Ct até 0,3 ciclos. Seguimos as orientações padrão de amplificação, sendo: primeiro ciclo 95 °C por 20s, 40 ciclos de 95 °C por 15s e 60 °C por 20s. O RQ para cada alvo escolhido foi determinado utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) disponível de forma gratuita na plataforma da Thermo Fisher Connect. (<https://www.thermofisher.com/br/en/home/digital-science/thermo-fisher-connect.html>). Um pool das amostras de cDNA do grupo sham foi usada como controle e os genes endógenos *GAPDH* e *PPIA* também foram utilizados para normalizar os dados do CT. Além disso foram testadas as eficiências de amplificação das sondas utilizando curva de diluição seriada (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 and 1:32), sendo aceitas variações entre 90 e 110%.

Descrição Estatística

O cálculo do N amostral foi feito utilizando-se a calculadora do site Sealed Envelope (<https://www.sealedenvelope.com/power/binary-superiority/>), considerando a taxa de gestação como desfecho clínico principal, com base em estudos anteriores do grupo em que foi verificada uma taxa de gestação de 100% nos animais do grupo sham

(aqui considerados controle) e de 50% no grupo de endometriose induzida tratado com placebo, para um poder de teste (beta) de 80% e nível de significância (alfa) de 5%, são necessários 8 animais por grupo de estudo.

RESULTADOS

Desfechos clínicos

Utilizamos modelo experimental para a indução de endometriose, totalizando 32 animais operados, sendo 16 com endometriose induzida e a outra metade grupo SHAM (apenas suturas na cavidade abdominal sem a implantação de tecido). As cirurgias foram realizadas no departamento de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Do total de animais operados tivemos perda de três animais, no pós-operatório precoce, provavelmente por complicações pós-cirúrgicas que não foram identificadas. Como resultados (gráfico 1) obtivemos dos grupos sham uma taxa de gravidez de 75% e 66,6% (ShamPI e ShamCX, respectivamente, $p > 0,05$). Já no grupo endometriose placebo tivemos apenas 37,5% de gravidez e após receber a injeção de CXCL12 os animais com endometriose apresentaram uma elevação para 62,5% na taxa de gravidez ($p=0.46$). Embora tenha sido um aumento clinicamente relevante nas taxas de gestação, não foi estatisticamente significativo.

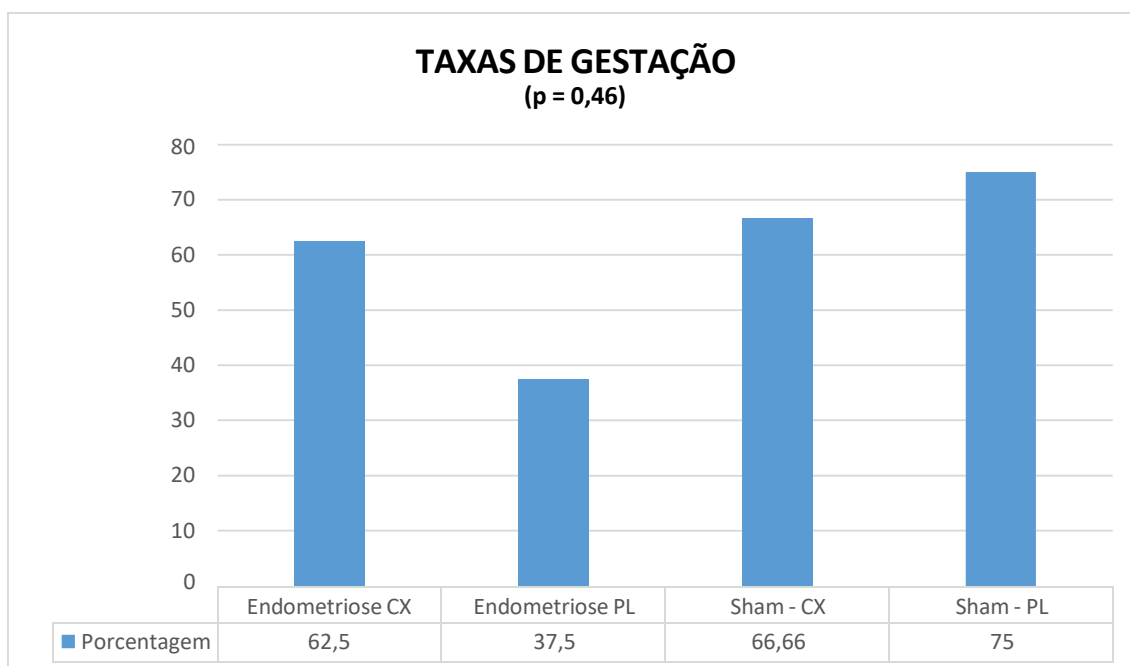


Gráfico 1 – Taxas de gestação em relação aos diferentes grupos

Análise da expressão gênica

Foi analisada a expressão dos genes *PGR* (responsável pela expressão dos receptores de progesterona), *CXCL12* e *CXCR4* (receptor do *CXCL12*), bem como dos coativadores do *PGR* no endométrio dos animais, sendo a amostra coletada por histerectomia após o reestabelecimento de ciclo estral, após o nascimento dos filhotes. O ciclo estral foi caracterizado por coleta de citologia vaginal e a histerectomia foi realizada na fase de diestro (que equivaleria a fase lútea). Os resultados desta expressão estão demonstradas na seguinte tabela 1:

Tabela 1. Expressão gênica dos genes relacionados aos receptores de progesterona e ao CXCL12:

GRUPO	GENES	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
SHAM CX	CXCL12	1.36740	1.82551
	CXCR4	1.65520	2.05750
	SRC-1	1.70140	2.26994
	SRC-2	1.17040	1.42124
	SRC-3	1.30800	1.67267
	PGR	1.18760	1.66062
SHAM PL	CXCL12	0.86775	1.05237
	CXCR4	1.29638	1.68596
	SRC-1	1.07088	1.24053
	SRC-2	0.84363	1.17552
	SRC-3	1.38200	1.90234
	PGR	0.40288	0.48761
ENDOM. CX	CXCL12	0.00350	0.00321
	CXCR4	0.00583	0.00306
	SRC-1	0.00367	0.00163
	SRC-2	0.00167	0.0008165
	SRC-3	0.00667	0.00327
	PGR	0.00200	0.00126
ENDOM. PL	CXCL12	0.93967	1.66155
	CXCR4	0.94744	1.51851
	SRC-1	0.58522	0.86859
	SRC-2	0.42778	0.64935
	SRC-3	2.28300	4.85375
	PGR	0.34756	0.52198

Na comparação da expressão dos genes entre os grupos estudados verificou-se que não houve expressão diferencial entre os grupos Sham (placebo ou CXCL12), indicando que em condições não patológicas o uso de *CXCL12* não afeta a expressão dos genes

avaliados. Também não foi verificada expressão diferencial entre os grupos sham e o grupo endometriose tratado com placebo, indicando que a endometriose em si parece não afetar a expressão dos mesmos.

Já em relação ao emprego do *CXCL12* em animais com endometriose, este resultou em redução na expressão de todos os genes avaliados (figura 8). Sendo assim na expressão do *PGR*, o grupo Endometriose CX foi menor que nos grupos Sham Placebo e Endometriose Placebo ($p < 0,05$, para ambas as comparações). Para o gene *CXCL12* o grupo Endometriose CX teve expressão inferior ao grupo Sham PI ($p < 0,05$), não diferindo dos demais grupos; entretanto, a expressão do *CXCR4* foi menor no grupo Endometriose CX em relação aos placebos tanto com endometriose como Sham ($p < 0,05$ para ambos). Por fim, em relação aos coativadores, todos os *SRCs* (*SRC-1*, *SRC-2* e *SRC-3*) seguiram o mesmo padrão de expressão semelhante entre os grupos sham e o grupo Endometriose Placebo, com redução da expressão no grupo Endometriose CX (figura 8).

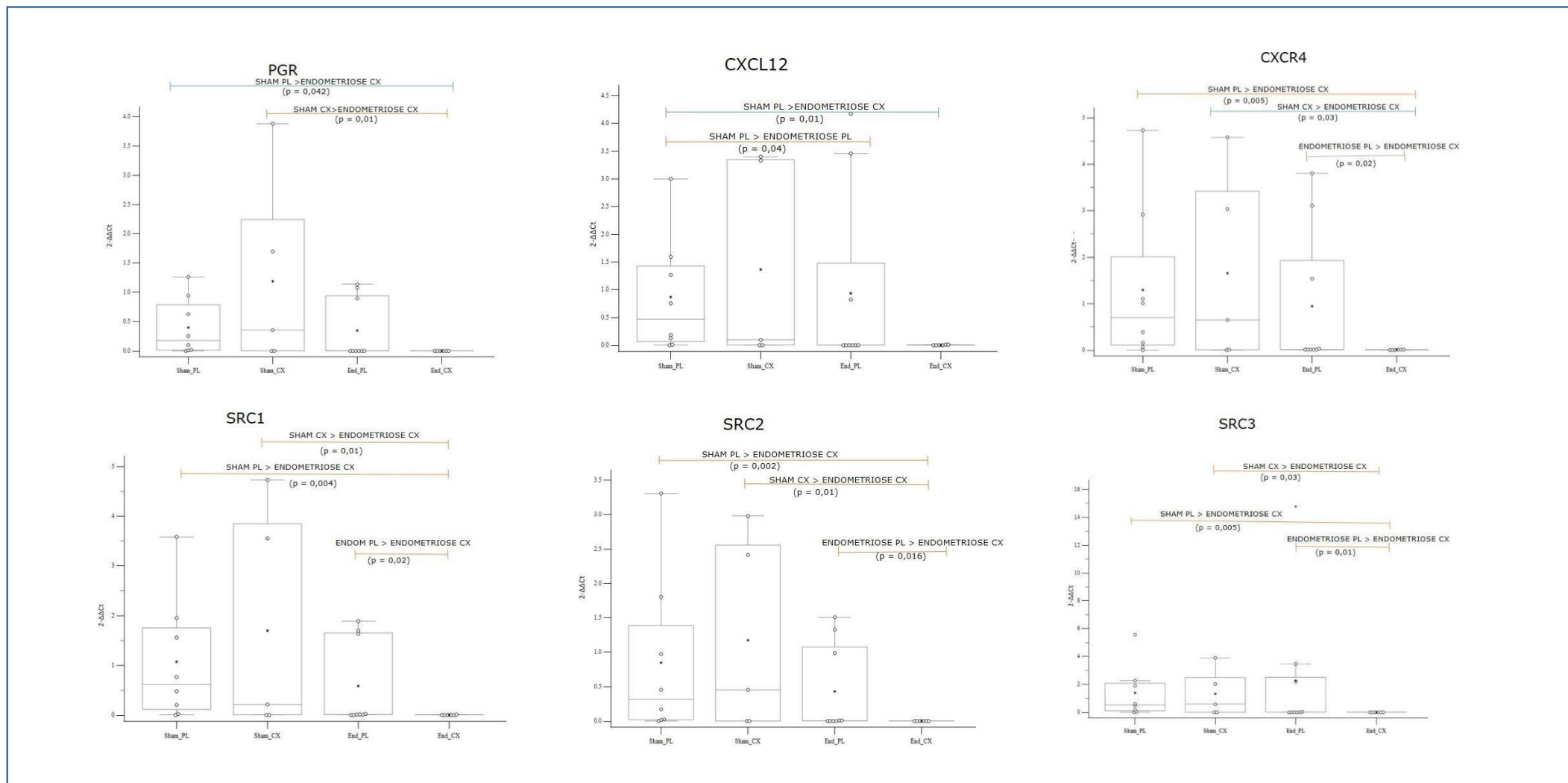


Figura 8. Expressão gênica dos genes em relação aos diferentes grupos.

Foi realizada também a correlação de Spearman entre os genes estudados. Inicialmente, numa tentativa de se comprovar uma correlação entre eles independente de intervenções ou morbidades, realizou-se a análise de correlação com todos os animais estudados em conjunto (em um mesmo grupo) (Figura 9). Verificou-se haver uma correlação direta entre a expressão do gene *PGR* e a expressão dos genes do *CXCL-12* e do *CXCR-4* no endométrio dos animais, com coeficientes de correlação de 0,82 ($p < 0,0001$) e 0,83 ($p < 0,0001$), respectivamente. Como esperado também houve correlação direta entre o *PGR* e os genes dos coativadores (*SRC1*, *SRC2* e *SRC3*), sendo os coeficientes todos maiores que 0,8 ($p < 0,0001$).

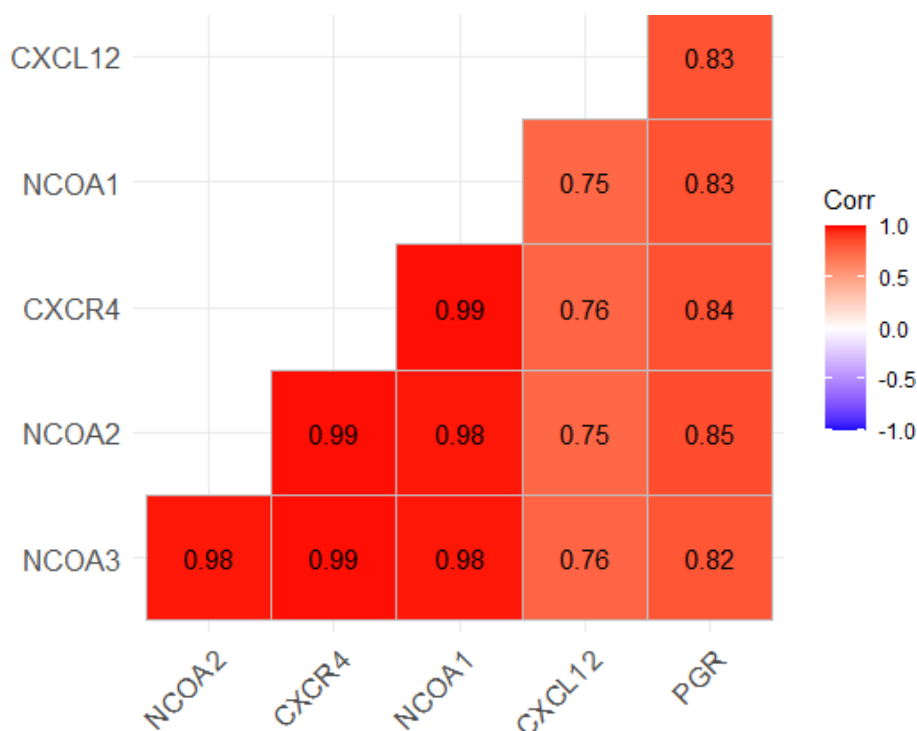


Figura 9. Correlação entre as expressões gênicas dos genes analisados considerando-se todos os grupos de estudo conjuntamente.

Ainda considerando-se todos os grupos conjuntamente, também foi verificada a correlação direta entre a expressão do *CXCL-12* com o *CXCR-4* ($p < 0,0001$), e a correlação de ambos com todos os coativadores estudados, sendo sempre a correlação

direta. Por fim, a correlação entre os coativadores entre si também foi comprovada, sendo as correlações entre os coativadores maiores que 0,97 ($p > 0,0001$) (tabela 2).

Ao observar as correlações entre os genes analisando-se separadamente os grupos de estudo, os dois grupos sham (placebo e CXCL12), mantiveram as correlações da avaliação global (somados todos os grupos). O grupo endometriose e placebo mantiveram as correlações entre *CXCL12* e *CXCR4* e as correlações entre estes dois com os coativadores, porém o *PGR* perdeu a correlação com todos os genes avaliados: *CXCL12*, *CXCR4* e os *SRCs 1, 2 e 3* (tabela 2).

	CXCL12	CXCR4	SRC1	SRC2	SRC3	PGR
CXCL12	1.00000	0.83414 0.0052	0.8341 4 0.0052	0.8112 1 0.0080	0.8517 0 0.0036	0.52697 0.1449
CXCR4	0.83414 0.0052	1.00000	1.0000 0 <.0001	0.9957 9 <.0001	0.9831 9 <.0001	0.52144 0.1500
SRC1	0.83414 0.0052	1.00000 <.0001	1.0000 0	0.9957 9 <.0001	0.9831 9 <.0001	0.52144 0.1500
SRC2	0.81121 0.0080	0.99579 <.0001	0.9957 9 <.0001	1.0000 0	0.9789 1 <.0001	0.52365 0.1479
SRC3	0.85170 0.0036	0.98319 <.0001	0.9831 9 <.0001	0.9789 1 <.0001	1.0000 0	0.50435 0.1662
PGR	0.52697 0.1449	0.52144 0.1500	0.5214 4 0.1500	0.5236 5 0.1479	0.5043 5 0.1662	1.00000

Tabela 2. Correlação entre as expressões gênicas dos genes analisados no grupo endometriose tratado com placebo

E finalmente, quando analisadas as correlações entre os genes no grupo endometriose e *CXCL12*, além da perda da correlação entre o *PGR* com todos os demais genes, a expressão do gene *CXCL12* passou a ter correlação inversa com a expressão dos coativadores *SRC1*, *SRC2* e *SRC3*, sendo os coeficientes de -0,73, -0,88 e -0,73,

respectivamente ($p < 0,05$) (tabela 3). Os coativadores mantiveram suas correlações diretas entre si e com o CXCR4.

	CXCL12	CXCR4	SRC1	SRC2	SRC3	PGR
CXCL12	1.00000 0.1228	-0.69825 0.1228	- 0.7392 5 0.0931	- 0.8853 6 0.0190	- 0.7392 5 0.0931	0.29032 0.5768
CXCR4	-0.69825 0.1228	1.00000	0.9856 1 0.0003	0.9258 2 0.0080	0.9856 1 0.0003	-0.15179 0.7741
SRC1	-0.73925 0.0931	0.98561 0.0003	1.0000 0	0.9393 4 0.0054	1.0000 0 <.0001	-0.21561 0.6816
SRC2	-0.88536 0.0190	0.92582 0.0080	0.9393 4 0.0054	1.0000 0	0.9393 4 0.0054	-0.22954 0.6617
SRC3	-0.73925 0.0931	0.98561 0.0003	1.0000 0 <.0001	0.9393 4 0.0054	1.0000 0	-0.21561 0.6816
PGR	0.29032 0.5768	-0.15179 0.7741	- 0.2156 1 0.6816	- 0.2295 4 0.6617	- 0.2156 1 0.6816	1.00000

Tabela 3. Correlação entre as expressões gênicas dos genes analisados no grupo endometriose tratado com CXCL12

DISCUSSÃO

Nossos resultados clínicos, mesmo que sem significância estatística, consideramos que foram clinicamente relevantes, uma vez que quase dobrou a taxa de gestação sendo relevante no que diz respeito a melhora nos desfechos reprodutivos.

Além disso, esses achados confirmam a reprodução do estudo anterior, cujos resultados foram compatíveis com os achados deste estudo, evidenciando uma redução nas taxas de gestação em modelos de endometriose não tratados e uma melhora no grupo tratado com o *CXCL12* (Rosa e Silva et al., 2022).

Inicialmente o *CXCL12* foi proposto no estudo de Rosa e Silva e colaboradores com o intuito de atrair células troncos da medula para o endométrio a fim de melhorar a qualidade endometrial, uma vez que foi demonstrado por Sakr et al (2014), que há uma redução da migração de células tronco da medula para o endométrio tópico de camundongos com endometriose, com migração preferencial destas células para os focos de lesão. Sendo o *CXCL-12* um quimiotático de células tronco, acreditava-se que a infusão desta substância diretamente nos cornos uterinos recuperaria a migração para o endométrio e melhoraria as taxas de gestação reduzida nestes animais. Entretanto, apesar de conseguir recuperar, ao menos parcialmente as taxas de gestação, não foi possível comprovar o maior influxo destas células para o útero (Rosa e Silva et al, 2022). Duas seriam as possíveis explicações para estes achados: 1. o tempo entre a histerectomia e a injeção de *CXCL12* foi muito longo e intermediado por uma gestação que poderia ter consumido estas células incorporando-as na placenta dequitada ou 2. o mecanismo de ação do *CXCL12* sobre a expressão dos receptores de progesterona no endométrio não foi mediado por células tronco, havendo possibilidade de um efeito local direto. Com este racional, este presente estudo propôs tentar esclarecer algumas questões relacionadas com o mecanismo de ação do *CXCL12* na expressão.

No estudo de Rosa e Silva e colaboradores foi verificado que o aumento nas taxas de gestação no grupo endometriose tratado com o *CXCL12* se associou ao aumento dos receptores de progesterona e também ao aumento das integrinas $\alpha V\beta 3$ no endométrio tópico dos animais, havendo inclusive uma proporcionalidade entre as taxas de gestação e a expressão dos receptores de progesterona. Por esse motivo aventou-se a possibilidade de um efeito do *CXCL12* direto sobre o endométrio. Na tentativa de encontrar o mecanismo pelo qual o tratamento com o *CXCL12* promoveu o aumento dos receptores de progesterona e integrinas, optamos por verificar a expressão de alguns genes ligados

à estes receptores, em especial ao receptor de progesterona. A hipótese era de que o *CXCL12* poderia ter influenciado no aumento da proteína de receptor de progesterona endometrial e esse aumento se correlaciona com a melhora nas taxas de gestação.

Sendo assim, a busca foi realizada na literatura e também no site GeneMANIA (Warde-Farley et al., 2010) (<https://genemania.org/>) e STRING database v11.5 at a low confidence score (0.150) (see in <https://version-11-5.string-db.org/cgi/network?networkId=bxS9AFSYn6mM>) (Szklarczyk et al., 2019). Os genes escolhidos foram o *SRC-1*, *SRC-2* e *SRC-3*.

A expressão dos genes estudados foi semelhante entre os grupos sham placebo, sham *CXCL12* e Endometriose placebo, inclusive os genes *PGR* e seus coativadores *SRC-1*, *SRC-1* e *SRC-3*. Com base no achado imunohistoquímico, a expectativa era de que o gene *PGR* estivesse hiperexpresso, uma vez que o receptor está mais expresso no endométrio, porém, deve haver um mecanismo de regulação intermediário ou a via ativada para o aumento do receptor de progesterona deve ser distinta da escolhida.

A resistência à progesterona na endometriose já vem sendo discutida por diferentes autores, no estudo de Arafah et al., 2021) e foi demonstrado que o endométrio eutópico de mulheres portadoras de endometriose passa por alterações que se relacionam com células inflamatórias e imunológicas, afetando de forma negativa a receptividade endometrial e contribuindo ao desenvolvimento da resistência à progesterona (Arafah et al., 2021) No tecido endometrial normal este hormônio inibe a atividade estrogênica que acaba por promover a atrofia do endométrio, entretanto, havendo resistência à ação da progesterona ocorre uma tendência ao efeito inverso. Os receptores de progesterona A e B (PRA e PRB) são responsáveis pela transcrição de proteínas expressas no tecido endometrial, porém no tecido endometriótico há transcrição somente de proteínas

transcritas pelo PRA, o que parece promover alterações na resposta final da progesterona (Attia, Edwards et al. 2000; Reis, Lhullier et al. 2005).

Tendo a expressão deste receptor semelhante entre os grupos sham e o grupo Endometriose Placebo, poderíamos supor que pode haver genes reguladores com expressão alterada ou interações anormais pela presença da doença. Verificamos que a expressão dos demais genes escolhidos são semelhantes entre estes grupos também, o que faz presumir que os genes envolvidos nesta regulação são outros. Ao analisar a correlação entre estes genes, houve forte correlação positiva entre eles no grupo sham. Porém nos grupos endometriose houve a perda de todas as correlações da expressão do *PGR* com os demais genes, independente de receber tratamento ou placebo. Na Endometriose Placebo as correlações entre *CXCL12* e o *CXCR4* e do *CXCL12* com os coativadores do *PGR* estão preservadas; bem como a correlação dos coativadores entre si.

Já no grupo Endometriose CX não só houve perda das correlações do *PGR* com todos os outros genes, como também o *CXCL12* perdeu sua correlação com o seu receptor *CXCR4* e passou a haver correlação inversa do *CXCL12* com os coativadores. É provável que o grande influxo de *CXCL12* banhando o tecido uterino reduziu a necessidade da expressão para a produção local do mesmo e reduziu a necessidade de expor seus receptores (*CXCR4*). Verifica-se então que existe um grande impacto do *CXCL12* sobre a expressão de genes ligados às vias da progesterona sugerindo assim um papel do *CXCL12* na melhora das taxas de gestação e aumento da expressão de receptores de progesterona no endométrio, interferindo nos mecanismos reguladores da expressão dos receptores deprogesterona.

Há uma relação entre o coativador *SRC-1* e o quimiotático *CXCL12*, onde esse último é regulado pelo estrogênio e tem a sua produção aumentada em tecidos ectópicos, impactando negativamente para a progressão da endometriose (Shi et al., 2014).

Os coativadores são responsáveis pela atividade transcricional de uma variedade de receptores nucleares, tendo preferência pelo receptor de progesterona (Szwarc et al., 2015). Ao investigar os papéis de *SRC-1* e *SRC-2* na expressão do *CXCL12* eles encontraram a estimulação da produção de *CXCL12* pelo estrogênio e também por outro lado a inibição de sua expressão pela progesterona. Através da técnica de silenciamento baseada em siRNA, foi demonstrado que há uma diminuição da expressão de *CXCL12* quando o coativador *SRC-1* está comprometido. Apontando para uma relação direta entre esses dois. E também a progesterona consegue inibir a produção de *CXCL12* de maneira dependente do *SRC-2* (Shi et al., 2014).

A confirmação das correlações entre os genes selecionados em nosso estudo levanta a importância da relação deles no que se refere tanto ao que diz respeito a endometriose e também aos desfechos reprodutivos, visto que eles estão implicados em ambos. Estudos futuros são necessários a fim de que levando em consideração o impacto e relação dos coativadores na expressão do *CXCL12* induzida pelo estrogênio, possa ser benéfico e acrescentar para a melhora e correções da resistência a progesterona. Vimos que não só a transcrição mediada pela progesterona requer o coativador *SRC-2* para lançar uma resposta decidual completa, mas também outros coativadores são necessários (Mukherjee et al., 2006). Considerando os nossos achados onde foi apresentada forte correlações entre os genes, não descarta a hipótese de que o *CXCL12* poderia se comportar com um coativador adjuvante. A identificação de mecanismos reguladores da expressão de moléculas ligadas ao processo de preparo de endométrio para a implantação tem grande importância para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas em situações de doença que afetam diretamente a receptividade endometrial e a implantação. A endometriose parece estar associada a menores taxas de implantação em ciclos de reprodução assistida, entretanto, os mecanismos exatos e as moléculas envolvidas neste

processo ainda não estão bem definidos. A literatura sobre o assunto tem sugerido uma redução da concentração de receptores de progesterona no endométrio tópico de indivíduos com endometriose, que acompanha de resistência à ação deste hormônio. Sendo a progesterona um elemento imprescindível para o adequado desenvolvimento endometrial pré-implantação, este poderia ser um dos motivos que justificariam a redução na receptividade endometrial na presença de endometriose. A literatura tem descrito sistematicamente um efeito regulador da progesterona sobre a expressão do CXCL12 em diferentes tecidos, entretanto, não há a informação inversa sobre um potencial efeito do CXCL12 sobre a expressão de receptores de progesterona. A confirmação de um efeito do CXCL12 na correção da resistência à ação da progesterona em indivíduos com endometriose abre uma possibilidade de nova opção terapêutica para mulheres com infertilidade associada à endometriose, com objetivo de melhorar resultados reprodutivos.

CONCLUSÃO

Neste presente estudo, o emprego de *CXCL12* aplicado diretamente no útero de camundongos fêmea com endometriose induzida promoveu a supressão da expressão de genes ligados à via da progesterona, tais como *PGR* e seus coativadores *SRCl*, *SCR2* e *SCR3*.

Existe uma correlação positiva entre a expressão do *PGR* com o *CXCL12* e seu receptor *CXCR4* no endométrio de animais com e sem endometriose induzida, a qual é perdida após a injeção de *CXCL12*.

A presença de endometriose promoveu a perda da correlação do *PGR* com o *CXCL12* e com seus coativadores.

A injeção de *CXCL12* diretamente no útero de animais com endometriose, levou à inversão da correlação na expressão do gene do *CXCL12* com os coativadores do *PGR* (*SCR1*, *SCR2* e *SCR3*).

-

REFERÊNCIAS

Aghajanova L, Hamilton AE, Giudice LC (2008) Uterine receptivity to human embryonic implantation: histology, biomarkers, and transcriptomics. *Semin Cell Dev Biol* 19:204–211

Allaire C (2006) Endometriosis and infertility: a review. *J Reprod Med* 51:164–168

Andres, M. P., Arcoverde, F. V. L., Souza, C. C. C., Fernandes, L. F. C., Abrão, M. S., & Kho, R. M. (2020). Extrapelvic Endometriosis: A Systematic Review. In *Journal of Minimally Invasive Gynecology* (Vol. 27, Issue 2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jmig.2019.10.004>

Arafah, M., Rashid, S., & Akhtar, M. (2021). *Endometriosis : A Comprehensive Review*. 28(1), 30–43.

Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002;77:1148–55.

Benagiano G, Brosens I (1991) The history of endometriosis: identifying the disease. *Hum Reprod*. 6:963–968

Burns WN, Schenken RS (1999) Pathophysiology of endometriosis-associated infertility. *Clin Obstet Gynecol* 42:586–610

Cahill DJ, Wardle PG, Maile LA, Harlow CR, Hull MG (1995) Pituitary ovarian dysfunction as a cause for endometriosis-associated and unexplained infertility. *Hum Reprod* 10:3142–3146

Cesar Rosa Silva, J., Passador Valerio, F., Herren, H., Kefalás Troncon, J., Garcia, R., & Benedicto Poli Neto, O. (2021). Endometriose Aspectos clínicos do diagnóstico ao tratamento. *Femina*, 49(3), 134–175.

Chan RW, Schwab KE, Gargett CE (2004) Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod* 70: 1738–1750

Cheesman KL, Ben N, Chatterton RT Jr, Cohen MR (1982) Relationship of luteinizing hormone, pregnanediol-3-glucuronide, and estriol-16-glucuronide in urine of infertile women with endometriosis. *Fertil Steril* 38:542–548

Crosignani P, Olive D, Bergqvist A, Luciano A. Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Hum Reprod Update*. 2006; 12(2): 179—189

Cunha-Filho JS, Gross JL, Bastos de Souza CA, Lemos NA, Giugliani C, Freitas F, Passos EP (2003) Physiopathological aspects of corpus luteum defect in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 20:117–121

Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA (2005) Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 11: 613–

630.

Doody MC, Gibbons WE, Buttram VC Jr (1988) Linear regression analysis of ultrasound follicular growth series: evidence for an abnormality of follicular growth in endometriosis patients. *Fertil Steril* 49:47–51

Donaghay M, Lessey BA (2007) Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease. *Semin Reprod Med* 25:461–475

Du H, Taylor HS. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells*. 2007;25(8):2082-2086.

Dlugi AM, Loy RA, Dieterle S, Bayer SR, Seibel MM (1989) The effect of endometriomas on in vitro fertilization outcome. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 6:338–341.

Eun Kwon H, Taylor HS (2004) The role of HOX genes in human implantation. *Ann N Y Acad Sci* 1034:1–18

Gargett CE, Schwab KE, Deane JA. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Hum Reprod Update*. 2016 Mar-Apr;22(2):137-63.

Glance L, Grygielko ET, Boyle R, et al. Estrogen-induced stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/Cxcl12) expression is repressed by progesterone and by Selective Estrogen Receptor Modulators via estrogen receptor alpha in rat uterine cells and tissues. *Steroids* 2009;74:1015-1024.

Giudice LC, Kao LC (2004) Cellular and molecular basis for endometriosis-associated infertility. *Endometriosis*. *Lancet* 364:1789–179

Gurpide E, Tabanelli S, Tang B (1992) Human endometrial stromal cells. In: Genazzani, A.R. and Petraglia, F. (eds) *Hormones in Gynecological Endocrinology*. Partenon Press, Casterton Hall. Carnforth, Lancs, UK: 717–724.

Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Rajj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol*. 1984;64(2): 151–154.

Han, S. J., Hawkins, S. M., Begum, K., Jung, S. Y., Kovanci, E., Qin, J., Lydon, J. P., Demayo, F. J., & O'Malley, B. W. (2012). A new isoform of steroid receptor coactivator-1 is crucial for pathogenic progression of endometriosis. *Nature Medicine*, 18(7), 1102–1111.

Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, Critchley HOD. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev*. 2006;27:17–46

Kryczek, I., Frydman, N., Gaudin, F., Krzysiek, R., Fanchin, R., Emilie, D., Chouaib, S., Zou, W., & Machelon, V. (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 contributes to T lymphocyte recruitment in human pre-ovulatory follicles and coordinates with

lymphocytes to increase granulosa cell survival and embryo quality. *American Journal of Reproductive Immunology*, 54(5), 270–283.

Kumar NS, Richer J, Owen G, Litman E, Horwitz KB, Leslie KK. Selective down-regulation of progesterone receptor isoform B in poorly differentiated human endometrial cancer cells: implications for unopposed estrogen action. *Cancer Res.* 1998;58:1860-5

Large MJ, Demayo FJ. The regulation of embryo implantation and endometrial decidualization by progesterone receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol* 2012;358:155–65.

Lessey BA. Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. *Steroids* 2003;68:809–15.

Lessey, B. A., & Kim, J. J. (2017). Endometrial receptivity in the eutopic endometrium of women with endometriosis: it is affected, and let me show you why. *Fertility and Sterility*, 108(1), 19–27.

Lessey BA, Palomino WA, Apparao KB, Young SL, Lininger RA. Estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and defects in uterine receptivity in women. *Reprod Biol Endocrinol* 2006;4(Suppl 1).

Lessey BA, Yeh I, Castelbaum AJ, Fritz MA, Ilesanmi AO, Korzeniowski P, et al. Endometrial progesterone receptors and markers of uterine receptivity in the window of implantation. *Fertil Steril* 1996; 65:477–83.

Lessey BA, Young SL. The structure, function, and evaluation of the female reproductive tract. In: Strauss JF III, Barbieri RL, editors. *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2012:192–235.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25:402–8.

Li X, Large MJ, Creighton CJ, Lanz RB, Jeong JW, Young SL, et al. COUP-TFII regulates human endometrial stromal genes involved in inflammation. *Mol Endocrinol* 2013;27:2041–54.

Li Z, Wang B, Kan Z, Zhang B, Yang Z, Chen J et al. (2012) Progesterone increases circulating endothelial progenitor cells and induces neural regeneration after traumatic brain injury in aged rats. *J. Neurotrauma* 29, 343–353.

Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, Yamane J, Iwanami A, Nagashima T, Ono M, Miyoshi H, Okano HJ, Ito M, Tamaoki N, Nomura T, Okano H, Matsuzaki Y, Yoshimura Y. Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/ immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:1925–30.

Meyer WR, Castelbaum AJ, Somkuti S, Sagoskin AW, Doyle M, Harris JE, et al. Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity. *Hum Reprod* 1997;12:1393–8.

Moridi, I., Mamillapalli, R., Cosar, E., Ersoy, G. S., & Taylor, H. S. (2017). Bone marrow stem cell chemotactic activity is induced by elevated CXCL12 in endometriosis. *Reproductive Sciences*, 24(4), 526–533. <https://doi.org/10.1177/1933719116672587>

Mukherjee, A., Soyal, S. M., Fernandez-Valdivia, R., Gehin, M., Chambon, P., DeMayo, F. J., Lydon, J. P., & O'Malley, B. W. (2006). Steroid Receptor Coactivator 2 Is Critical for Progesterone-Dependent Uterine Function and Mammary Morphogenesis in the Mouse. *Molecular and Cellular Biology*, 26(17), 6571–6583. <https://doi.org/10.1128/mcb.00654-06>.

Nácul, A. P., & Spritzer, P. M. (2010). Aspectos Atuais Do Diagnóstico E Tratamento Da Endometriose. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*, 32(6), 298–307. <https://doi.org/10.1590/S0100-72032010000600008>

Neykova, K., Tosto, V., Giardina, I., Tsibizova, V., & Vakrilov, G. (2020). Endometrial receptivity and pregnancy outcome. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 0(0), 1–15. <https://doi.org/10.1080/14767058.2020.1787977>

Ozkan, S., Murk, W., & Arici, A. (2008). Endometriosis and infertility: Epidemiology and evidence-based treatments. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1127, 92–100. <https://doi.org/10.1196/annals.1434.007>

Palomino, D. C. arolin. T., & Marti, L. C. avalheir. (2015). Chemokines and immunity. *Einstein (São Paulo, Brazil)*, 13(3), 469–473. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RB3438>

Pluchino, N., Mamillapalli, R., Shaikh, S., Habata, S., Tal, A., Gaye, M., & Taylor, H. S. (2020). CXCR4 or CXCR7 antagonists treat endometriosis by reducing bone marrow cell trafficking. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(4), 2464–2474. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14933>

Rosa-E-Silva ACJS, Mamillapalli R, Rosa-E-Silva JC, Ucar A, Schwartz J, Taylor HS. Uterine administration of CXCL12 increases pregnancy rates in mice with induced endometriosis. *F S Sci*. 2022 Oct 14;S2666-335X(22)00065-9. doi: 10.1016/j.xfss.2022.10.003. Epub ahead of print. PMID: 36252793.

Sahin Ersoy, G., Zhou, Y., Inan, H., Taner, C. E., Cosar, E., & Taylor, H. S. (2017). Cigarette Smoking Affects Uterine Receptivity Markers. *Reproductive Sciences*, 24(7), 989–995. <https://doi.org/10.1177/1933719117697129>

Sharif S, Hanyia N, Barry K and Hugh S. Tavlorm. Endometriosis Impairs Bone Marrow-Derived Stem Cell Recruitment to the Uterus Whereas Bazedoxifene Treatment Leads to Endometriosis Regression and Improved Uterine Stem Cell Engraftment. *Endocrinology*. 2014 Apr; 155(4): 1489—1497.

Stilley JA, Birt JA, Sharpe-Timms KL. Cellular and molecular basis for endometriosis-associated infertility. *Cell Tissue Res.* 2012 Sep;349(3):849-62.

Szwarc, M. M., Kommagani, R., Lessey, B. A., & Lydon, J. P. (2014). The p160/steroid receptor coactivator family: Potent arbiters of uterine physiology and dysfunction1. *Biology of Reproduction*, 91(5), 1–11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.125021>

Szwarc, M. M., Lydon, J. P., & O'Malley, B. W. (2015). Steroid receptor coactivators as therapeutic targets in the female reproductive system. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 154, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.010>

Kryczek, I., Frydman, N., Gaudin, F., Krzysiek, R., Fanchin, R., Emilie, D., Chouaib, S., Zou, W., & Machelon, V. (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 contributes to T lymphocyte recruitment in human pre-ovulatory follicles and coordinates with lymphocytes to increase granulosa cell survival and embryo quality. *American Journal of Reproductive Immunology*, 54(5), 270–283. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2005.00307.x>

Kuroda K, Kitade M, Kikuchi I, Kumakiri J, Matsuoka S, Kuroda M, et al. The impact of endometriosis, endometrioma and ovarian cystectomy on assisted reproductive technology. *Reprod Med Biol* 2009;8:113–8.

Leconte M, Chouzenoux S, Nicco C, et al. Role of the CXCL12 CXCR4 axis in the development of deep rectal endometriosis. *J Reprod Immunol.* 2014;103:45-52.

Lessey, B. A., & Kim, J. J. (2017). Endometrial receptivity in the eutopic endometrium of women with endometriosis: it is affected, and let me show you why. *Fertility and Sterility*, 108(1), 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.05.031>

Mahmood TA, Arumugam K, Templeton AA. Oocyte and follicular fluid characteristics in women with mild endometriosis. *Br J Obstet Gynaecol* 1991;98:573–7.

Marquardt, R. M., Kim, T. H., Shin, J. H., & Jeong, J. W. (2019). Progesterone and estrogen signaling in the endometrium: What goes wrong in endometriosis? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15). <https://doi.org/10.3390/ijms20153822>

Moridi, I., Mamillapalli, R., Cosar, E., Ersoy, G. S., & Taylor, H. S. (2017). Bone marrow stem cell chemotactic activity is induced by elevated CXCL12 in endometriosis. *Reproductive Sciences*, 24(4), 526–533. <https://doi.org/10.1177/1933719116672587>

Mukherjee, A., Soyak, S. M., Fernandez-Valdivia, R., Gehin, M., Chambon, P., DeMayo, F. J., Lydon, J. P., & O'Malley, B. W. (2006). Steroid Receptor Coactivator 2 Is Critical for Progesterone-Dependent Uterine Function and Mammary Morphogenesis in the Mouse. *Molecular and Cellular Biology*, 26(17), 6571–6583. <https://doi.org/10.1128/mcb.00654-06>

Nácul, A. P., & Spritzer, P. M. (2010). Aspectos Atuais Do Diagnóstico E Tratamento Da Endometriose. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*, 32(6), 298–307. <https://doi.org/10.1590/S0100-72032010000600008>

Neykova, K., Tosto, V., Giardina, I., Tsibizova, V., & Vakrilov, G. (2020). Endometrial receptivity and pregnancy outcome. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 0(0), 1–15. <https://doi.org/10.1080/14767058.2020.1787977>

Ozkan, S., Murk, W., & Arici, A. (2008). Endometriosis and infertility: Epidemiology and evidence-based treatments. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1127, 92–100. <https://doi.org/10.1196/annals.1434.007>

Palomino, D. C. arolin. T., & Marti, L. C. avalheir. (2015). Chemokines and immunity. *Einstein (São Paulo, Brazil)*, 13(3), 469–473. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RB3438>

Padykula HA, Coles LG, McCracken JA, King NW Jr, Longcope C, Kaiser man Abram of IR. A zonal pattern of cell proliferation and differentiation in the rhesus endometrium during the estrogen surge. *Biol Reprod* 1984;31:1103–1118.

Padykula HA. Regeneration in the primate uterus: ther ole of stem cells. *AnnNY AcadSci* 1991;622:47–56

Peluso JJ, Liu X, Saunders MM, Claffey KP, Phoenix K (2008) Regulation of ovarian cancer cell viability and sensitivity to cisplatin by progesterone receptor membrane component-1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 1592–1599.

Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1–CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol.* 2007;28:299-307.

Pluchino, N., Mamillapalli, R., Shaikh, S., Habata, S., Tal, A., Gaye, M., & Taylor, H. S. (2020). CXCR4 or CXCR7 antagonists treat endometriosis by reducing bone marrow cell trafficking. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(4), 2464–2474. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14933>

Rosa-e-Silva ACJS, Rosa-e-Silva JC, Mamillapalli R, Taylor HS. Uterine injection of SDF-1/CXCL12 increases pregnancy rates in mice with endometriosis. 2018, Unpublished data.

Sahin Ersoy, G., Zhou, Y., Inan, H., Taner, C. E., Cosar, E., & Taylor, H. S. (2017). Cigarette Smoking Affects Uterine Receptivity Markers. *Reproductive Sciences*, 24(7), 989–995. <https://doi.org/10.1177/1933719117697129>

Salamonsen LA. Tissue injury and repair in the female human reproductive tract. *Reproduction.* 2003;125:301–11.

Sharif S, Hanyia N, Barry K and Hugh S. T. Endometriosis Impairs Bone Marrow-Derived Stem Cell Recruitment to the Uterus Whereas Bazedoxifene Treatment Leads to Endometriosis Regression and Improved Uterine Stem Cell Engraftment. *Endocrinology.* 2014; 155(4): 1489-1497.

- Sarkar NN. Mifepristone: bioavailability, pharmacokinetics and use effectiveness. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002;101(2):113-20
- Shi, X., Xu, W., Dai, H. H., Sun, Y., & Wang, X. L. (2014). The role of SRC1 and SRC2 in steroid-induced SDF1 expression in normal and ectopic endometrium. *Reproduction*, 147(6), 847–853. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0027>
- Spencer TE, Hayashi K, Hu J, Carpenter rKD. Comparative developmental biology of the mammalian uterus. *Curr Top Dev Biol* 2005;68:85–122.
- Stilley, J. A. W., Birt, J. A., & Sharpe-Timms, K. L. (2012). Cellular and molecular basis for endometriosis-associated infertility. *Cell and Tissue Research*, 349(3), 849–862. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1309-0>
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: Proteinprotein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D607–13
- Szwarc, M. M., Lydon, J. P., & O'Malley, B. W. (2015). Steroid receptor coactivators as therapeutic targets in the female reproductive system. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 154, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.010>
- Taylor, H. S., Kotlyar, A. M., & Flores, V. A. (2021). Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges and novel innovations. *The Lancet*, 397(10276), 839–852. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00389-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00389-5).
- Tomassetti C, Meuleman C, Pexsters A, Mihalyi A, Kyama C, Simsa P, D'Hooghe TM. Endometriosis, recurrent miscarriage and implantation failure: is there an immunological link? *Reprod Biomed Online.* 2006 Jul;13(1):58-64.
- Van den Berg LL, Crane LM, van Oosten M, et al. Analysis of biomarker expression in severe endometriosis and determination of possibilities for targeted intraoperative imaging. *Int J Gynaecol Obstet.* 2013;121(1):35-40
- Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett.* 267(2): 226-244.
- Wang X, Mamillapalli R, Mutlu L, Du H, Taylor HS. Chemoattraction of bone marrow-derived stem cells towards human endometrial stromal cells is mediated by estradiol regulated CXCL12 and CXCR4 expression. *Stem cell research.* 2015;15:14-22.
- Yanushpolsky EH, Best CL, Jackson KV, Clarke RN, Barbieri RL, Hornstein MD. Effects of endometriomas on oocyte quality, embryo quality, and pregnancy rates in vitro fertilization cycles: a prospective, case-controlled study. *J Assist Reprod Genet.* 1998 Apr;15(4):193-7.
- Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol.* 2006;7(12):243.

Zhou Y, Gan Y, Taylor HS. Cigarette smoke inhibits recruitment of bone marrow-derived stem cells to the uterus. *Reprod Toxicol* 2011;31:123–127.

