

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA**

**Análise exploratória do miRNoma de células-tronco mesenquimais isoladas de fluxo menstrual de mulheres com endometriose**

**ANA CLARA LAGAZZI CRESSONI**

**Ribeirão Preto**

**2023**

**ANA CLARA LAGAZZI CRESSONI**

**Análise exploratória do miRNoma de células-tronco mesenquimais isoladas de fluxo menstrual de mulheres com endometriose**

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).

Trabalho de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia - Opção: Biologia da Reprodução

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Juliana Meola Lovato

**Ribeirão Preto**

**2023**

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

Cressoni, Ana Clara Lagazzi

Análise exploratória do miRNoma de células-tronco mesenquimais isoladas de fluxo menstrual de mulheres com endometriose/ Ana Clara Lagazzi Cressoni; orientadora, Juliana Meola Lovato. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023.

77 p.: 8il.; 30 cm

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

1. Endometriose; 2. miRNoma; 3. células-tronco mesenquimais de fluxo menstrual.

Nome: CRESSONI, Ana Clara Lagazzi

Título: Análise exploratória do miRNoma de células-tronco mesenquimais isoladas de fluxo menstrual de mulheres com endometriose.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof<sup>ª</sup>. Dra.: Juliana Meola Lovato

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Julgamento: Favorável

Prof. Dr.: Willian Abraham da Silveira

Instituição: School of Health, Science and Wellbeing, Staffordshire University

Julgamento: Favorável

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>.: Adriana L. Invitti

Instituição: Departamento de Ginecologia, Universidade Federal de São Paulo

Julgamento: Favorável

Aos meus pais, Analucia e Ivair

Ao Gabriel,

À minha avó Lúcia,

Por serem meu porto seguro.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais por sempre me apoiaram em todas as escolhas, além do incentivo de seguir meus sonhos. Sem o amor e a compreensão deles, eu não teria sido capaz de chegar tão longe.

Ao Gabriel pela compreensão e toda a ajuda. Você faz com que eu me sinta segura, protegida e amada.

Aos meus avós, por sempre estarem presentes, me amando, apoiando e por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditava.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Meola e às técnicas de laboratório Cristiana e Lilian, que dedicaram seu tempo e esforço para que esse trabalho fosse concluído.

Aos companheiros de jornada, que continuemos percorrendo os caminhos da Ciência, apesar de todos os empecilhos. E que sejamos capazes de nos encorajar e de manter a motivação em momentos difíceis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) pelo apoio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através do auxílio a projetos de pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia (PPGGO), Departamento de Ginecologia e Obstetrícia (DGO), da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), Hormônios e Saúde da Mulher, por fornecerem o suporte financeiro e estrutural.

Às pacientes que doaram as amostras e permitiram que o estudo acontecesse.

## RESUMO

CRESSONI, A. C. L. **Análise exploratória do miRNoma de células-tronco mesenquimais isoladas de fluxo menstrual de mulheres com endometriose**. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Um problema de saúde pública, a endometriose é uma doença ginecológica benigna, estrogênio dependente e inflamatória crônica, caracterizada pela presença de tecido endometrial ectópico. Tem sido alvo de intensa investigação devido a sua etiopatogenia complexa e multifatorial. Nesse contexto, a teoria da menstruação retrógrada traz a ideia de que componentes do fluxo menstrual podem atuar no desenvolvimento das lesões. Concomitante ao recente achado de células-tronco no sangue menstrual (MenSCs), o conhecimento sobre alterações de transcritos, a crescente importância de mecanismos regulatórios pós-transcricionais na doença e também, a presença de perfis de expressão de microRNAs distintos entre tecidos endometrióticos e não-endometrióticos, o estudo do miRNoma dessas células pode elucidar a participação delas no desenvolvimento e manutenção da endometriose. Nosso achado recente sobre a desregulação da via canônica de biossíntese de microRNAs em MenSCs endometrióticas reforça essa hipótese. Esse trabalho tem como objetivo comparar o perfil de expressão de microRNAs, através de sequenciamento de nova geração, em MenSCs de mulheres com e sem endometriose, e destacar vias gênicas reguladas por eles que podem participar da etiopatogenia da endometriose. Estudos comparativos desse tipo são inéditos. As MenSCs incluídas fazem parte de um biorrepositório do setor de Reprodução Humana do DGO FMRP-USP. Após o sequenciamento global de microRNAs, análises *in silico* foram realizadas para predizer expressão diferencial e enriquecimento funcional de genes e vias reguladas pelos microRNAs diferencialmente expressos. São relatados nove miRNAs com expressão diferencial (hsa-miR-1271-5p, hsa-miR-125b-2-3p, hsa-miR-181a-2-3p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-1304-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-337-5p). Também identificamos através de análises *in silico* vias e genes regulados por testes DEmiRs que possivelmente estão relacionados à mecanismos moleculares alterados na endometriose. Os genes *LCOR*, *PLS3*, *INO80D*, *TNRC6B* são regulados por pelo menos sete destes miRNAs, sendo três genes já estudados na doença e estão envolvidos com vias celulares de: silenciamento pós-transcricional por pequenos RNAs, RNAs endógenos concorrentes (ceRNAs) reguladores da tradução do PTEN, regulação da tradução do mRNA do PTEN,

regulação da expressão e atividade da RUNX1, senescência induzida por oncogene, regulação da expressão e atividade de MECP2, regulação da transcrição por MECP2, ativação de receptores NMDA e eventos pós-sinápticos, long-term depression e sinapse glutamatérgica que, quando desreguladas, podem ser cruciais para a etiopatogenia da endometriose. Nossos resultados podem direcionar a identificação de desafios e oportunidades de pesquisa futura, bem como contribui para a promoção do conhecimento acerca do papel das células-tronco mesenquimais na etiopatogenia da endometriose.

**Palavras-chave:** endometriose; miRNoma; células-tronco mesenquimais de fluxo menstrual.



## ABSTRACT

CRESSONI, A. C. L. **Exploratory analysis of the miRNoma from mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood of women with endometriosis**. 2023. Dissertation (Masters Degree in Sciences) – – Graduated Program in Gynecology and Obstetrics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A public health problem, endometriosis is a benign gynecological disease, estrogen-dependent, and chronic inflammatory, characterized by the growth of ectopic endometrial tissue. It has been the subject of intense investigation due to the etiopathogenesis complex and multifactorial. In this context, the retrograde menstruation theory shows that cellular components of menstrual blood may act in the development of the lesions. Concomitant to the recent found of progenitor stem cells in the menstrual blood (MenSCs), the knowledge about transcriptomic profile alterations, the crescent importance of post-transcriptional regulator molecules in the disease, as well as the presence of distinct miRNAs profile between endometriotic and non-endometriotic tissues, the miRNoma study in these cells can elucidate the possible participation of MenSCs in the development and maintenance of endometriosis. Our recent findings of dysregulation of the canonical microRNAs biogenesis pathway in the endometriotic MenSCs reinforce this hypothesis. This work aims to compare the profile of microRNAs expressed through Next Generation Sequencing in MenSCs of women with and without endometriosis and highlight gene pathways regulated by them that may participate in the endometriosis' etiopathogenesis. Comparative studies like this are unprecedented. The MenSCs included here are part of a biorepository in the section of Human Reproduction from DGO FMRP-USP. After global sequencing of microRNAs, *in silico* analyses were performed to predict differential expression and functional enrichment of genes and pathways regulated by differentially expressed microRNAs. Nine miRNAs with differential expression are reported (hsa-miR-1271-5p, hsa-miR-125b-2-3p, hsa-miR-181a-2-3p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-1304-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-337-5p). We also identified through *in silico* analysis pathways and genes regulated by DEmiRs tests that are possibly related to altered molecular mechanisms in endometriosis. The *LCOR*, *PLS3*, *INO80D*, and *TNRC6B* genes are regulated by at least seven of these miRNAs, three of which have already been studied in the disease and are involved in cellular pathways of: post-transcriptional silencing by small RNAs, endogenous competing RNAs (ceRNAs) regulatory PTEN translation, regulation of PTEN mRNA translation, regulation of RUNX1 expression and

activity, oncogene-induced senescence, regulation expression and activity of MECP2, regulation of transcription by MECP2, activation of NMDA receptors and postsynaptic events, long-term depression and glutamatergic synapse which, when deregulated, may be crucial for the etiopathogenesis of endometriosis. Our results can guide the identification of challenges and opportunities for future research and promote knowledge about the role of mesenchymal stem cells in the etiopathogenesis of endometriosis.

**Keywords:** endometriosis, miRNome, menstrual blood mesenchymal stem cells.

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1:** Dados clínicos das pacientes incluídas no estudo. Fonte: DE OLIVEIRA et al., 2022.

**Tabela 2:** Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo das MenSCs. Fonte: DE OLIVEIRA et al., 2022.

**Tabela 3:** Resumo dos dados gerados pelo MultiQC

**Tabela 4:** DEmiRs

**Tabela 5:** Revisão de literatura sobre os genes regulados pelos DEmiRs em endometriose

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Fluxograma de coleta das amostras. **Fonte:** PENARIOL et al., 2022.

**Figura 2:** Diferenciação celular das MenSCs em adipócitos e osteócitos. **Fonte:** (DE OLIVEIRA et al., 2022).

**Figura 3:** Fluxograma das MenSCs utilizadas para avaliação de DEmiRs

**Figura 4:** Integridade do RNA total

**Figura 5:** Boxplots representativos da expressão dos DEmiRs em cada grupo.

**Figura 6:** Rede de interação molecular miRNA-alvo gerada pelo Cytoscape. **A:** graus de centralidade 6 e 7. **B:** Grau de centralidade 7.

**Figura 7:** Vias enriquecidas com  $FDR < 0,05$  no Webgestalt para os graus de centralidade 4-7 do Cytoscape

**Figura 8:** Boxplots e pontos representativos dos valores de Ct para o miR-1271-5p.

## **LISTA DE ABREVIATURAS MAIS UTILIZADAS**

**eMSCs:** células-tronco mesenquimais endometriais

**EMT:** transição epitélio-mesenquimal

**MenSCs:** células-tronco mesenquimais derivadas do fluxo menstrual

**miRNA:** microRNA

**mRNA:** RNA mensageiro

**MSC:** célula-tronco mesenquimal

**DEmiRs:** microRNAs diferencialmente expressos



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1. MiRNA: estrutura e função	18
2. miRNAs e o endométrio	19
3. Endometriose	19
4. Teoria da Implantação	20
5. Células-tronco e Tecido Endometrial Ectópico	21
6. Componentes do fluxo menstrual e a Endometriose	22
7. Componente Genético da Endometriose	23
8. miRNAs e endometriose	23
9. Achados anteriores do grupo em MenSCs e Hipótese	24
10. Justificativa	25
<b>OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
Aprovação ética, locais e duração	30
Participantes e Critérios de Elegibilidade	31
Figura 1: Fluxograma de coleta das amostras. Fonte: PENARIOL et al., 2022.	32
Tabela 1: Dados clínicos das pacientes incluídas no estudo. Fonte: DE OLIVEIRA et al., 2022.	32
Amostras armazenadas no biorrepositório	33
Tabela 2: Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo das MenSCs. Fonte: DE OLIVEIRA et al., 2022.	34
Figura 2: Diferenciação celular das MenSCs em adipócitos e osteócitos. Fonte: DE OLIVEIRA et al., 2022.	35
Isolamento, integridade e quantificação de RNA total	35
miRNoma	36
Funções biológicas desempenhadas pelos DEmiRs	37
Validação quantitativa do miR-1271-5p por RT-qPCR	38
<b>RESULTADOS</b>	<b>40</b>
Fluxo de trabalho do estudo	40
Figura 3: Fluxograma do estudo	42
Figura 4: Os eletroferogramas das amostras foram obtidos com a aplicação do Agilent 2100 Bioanalyzer e RNA 600 Nano Kit.	43
miRNoma	44
Tabela 3: Resultados obtidos no MultiQC para cada amostra sequenciada quanto aos milhões de leituras mapeadas, porcentagem de mapeamento e total de sequências	44
Tabela 4: DEmiRs	45
Figura 5: Box Plots representativos da expressão dos DEmiRs em cada grupo.	46
Funções biológicas desempenhadas pelos DEmiRs	47
Figura 6: Rede de interação molecular miRNA-alvo gerada pelo Cytoscape.	48
Tabela 5: Revisão de literatura sobre os genes regulados pelos DEmiRs (graus de centralidade 6 e 7) em endometriose	49

Figura 7: Vias enriquecidas com 265 genes no Webgestalt para os graus de centralidade de 4 a 7 determinados no Cytoscape.	53
Avaliação da expressão do miR-1271-5p por RT-qPCR	54
Figura 8: Boxplots e pontos representativos dos valores de Ct para o miR-1271-5p.	54
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>55</b>
1. Silenciamento pós-transcricional por pequenos RNAs	56
2. Os RNAs endógenos concorrentes (ceRNAs) reguladores da tradução do PTEN e regulação da tradução do mRNA do PTEN	57
3. Regulação da expressão e atividade da RUNX1	58
4. Senescência induzida por oncogene	59
5. Regulação da expressão e atividade de MECP2 e regulação de transcrição por MECP2	60
6. Ativação de receptores NMDA e eventos pós-sinápticos	61
7. Long-term depression	61
8. Sinapse glutamatérgica	62
Pontos fortes e limitações do estudo	62
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>66</b>
<b>ANEXOS</b>	
Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética	75
Anexo B - Artigo publicado relacionado à tese	77



## ***INTRODUÇÃO***

## 1. MiRNA: estrutura e função

MicroRNAs (miRNAs) são estruturas de fita simples, com cerca de 20 a 30 nucleotídeos, e são capazes de reconhecer seus alvos de RNA em regiões conservadas (seed region) mais frequentemente localizadas nas posições de 2 a 7 nucleotídeos da porção 5' final do miRNA, região crucial para seu direcionamento e função (BUSHATI; COHEN, 2007; SALIMINEJAD et al., 2019). Classicamente, ligam-se a região 3' UTR (*untranslated region*) do RNA mensageiro (mRNA), através do emparelhamento de bases, o que causa uma instabilidade estrutural e promove o recrutamento de fatores que induzem repressão translacional, deadenilação e conseqüentemente o declínio do mRNA (HA; KIM, 2014).

A descoberta inicial do papel dos miRNAs na regulação gênica ocorreu em 1993, com a descoberta do gene LIN-4 em nematoides, um gene que codifica um RNA não codificante em forma de grampo de cabelo, com 22 nucleotídeos e que se liga e suprime a tradução do mRNA de LIN14 (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Em 2000, este novo mecanismo de regulação gênica foi confirmado com a descoberta de que os transcritos de let-7 têm papel semelhante no controle pós-transcricional em nematoides (REINHART et al., 2000). Desde então, mais de 2500 miRNAs foram identificados (KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2019) e estudados em uma ampla gama de organismos, e tornou-se evidente que essas estruturas e suas funções são altamente conservadas em organismos distantemente relacionados (HA et al., 2008).

Estão associados a uma ampla variedade de processos biológicos, desde o desenvolvimento embrionário (GROSS; KROPP; KHATIB, 2017) até a diferenciação celular (POSNER; LAUBENBACHER, 2019), reparo tecidual e regeneração (SEN; GHATAK, 2015), metabolismo (HARTIG et al., 2015) e, resposta imune (LU; LISTON, 2009). Os miRNAs desempenham um papel primordial na regulação da expressão gênica, desencadeando alterações no perfil proteico (BAEK et al., 2008), visto que, o aumento da expressão de um miRNA leva à repressão da tradução do mRNA alvo, em contrapartida, a regulação negativa do miRNA exerce o efeito oposto, o que afeta numerosas vias moleculares e causa alterações celulares e teciduais (CATALANOTTO; COGONI; ZARDO, 2016; YING; CHANG; LIN, 2008). Dessa forma, os efeitos combinados de vários miRNAs podem influenciar a saúde e a doença (OSMAN, 2012; SANTAMARIA; TAYLOR, 2014).

## 2. miRNAs e o endométrio

Um dos tecidos precisamente regulado por miRNAs é o endométrio, que passa por mudanças estruturais e funcionais ao longo dos ciclos menstruais, sob controle molecular rigoroso de estímulos hormonais (TAMARU et al., 2020). A interação funcional entre microRNAs e hormônios sexuais no endométrio é bidirecional. Durante a fase proliferativa, o estrogênio inibe miRNAs supressores de tumor e induz os oncogênicos, possivelmente através da regulação da maquinaria de biossíntese (COCHRANE; CITTELLY; RICHER, 2011; KLINGE, 2012). Em contrapartida, os miRNAs são responsáveis por regular a expressão dos receptores nucleares ER $\alpha$  e ER $\beta$  e PR-A e PR-B. Ademais, miRNAs estão presentes no fluido luminal uterino, sugerindo participação também no processo de implantação e desenvolvimento do embrião (KOLANSKA et al., 2021).

Dessa forma, é esperado que em patologias endometriais haja desregulações de miRNAs e seus alvos, sendo observado em falhas recorrentes de implantação de embriões (KOLANSKA et al., 2021; SANTAMARIA; TAYLOR, 2014), câncer endometrial (KOLANSKA et al., 2021; LA FERLITA et al., 2018; SANTAMARIA; TAYLOR, 2014; TAMARU et al., 2020), leiomiomas (SANTAMARIA; TAYLOR, 2014), gravidez ectópica (TAMARU et al., 2020), endometrite crônica (LA FERLITA et al., 2018) e endometriose (KOLANSKA et al., 2021; LA FERLITA et al., 2018; OHLSSON TEAGUE et al., 2009; SANTAMARIA; TAYLOR, 2014; TAMARU et al., 2020). Sendo a última objeto de estudo desse trabalho.

## 3. Endometriose

Endometriose é um distúrbio ginecológico benigno, caracterizado pela presença e crescimento de tecido endometrial ectópico, tem natureza multissistêmica, é inflamatório crônico e estrogênio dependente (ZONDERVAN; BECKER; MISSMER, 2020). O quadro clínico é heterogêneo, os sinais clínicos mais frequentes associados à condição incluem dor pélvica crônica, dismenorreia, dispareunia, problemas gastrointestinais e/ou urinários relacionados à menstruação e infertilidade (KUZNETSOV et al., 2017). Os processos endócrinos, imunológicos, pró-inflamatórios e pró-angiogênicos envolvidos no desenvolvimento da endometriose são multifatoriais e sua causa ainda não está completamente compreendida (WANG; NICHOLAS; SHIH, 2020).

Sua etiopatogenia permanece indeterminada, com diversas teorias elaboradas para explicá-la, incluindo a implantação (SAMPSON, 1940), metaplasia celômica

(GRUENWALD, 1942), indução (LEVANDER; NORMANN, 1955) e disseminação linfo-vascular (JERMAN; HEY-CUNNINGHAM, 2015). E apesar de muitas, nenhuma dessas prerrogativas sozinhas são capazes de explicar por qual razão a doença se origina.

É provavelmente o resultado da combinação de vários processos biológicos aberrantes, que incluem: 1) menstruação retrógrada, disseminação linfovascular e/ou metaplasia em mulheres com função imune prejudicada; 2) células com mecanismos moleculares anômalos que compõem o endométrio eutópico e ectópico; 3) predisposição genética e/ou epigenética para o desenvolvimento de implantes ectópicos; 4) a presença de células progenitoras alteradas originárias do endométrio e descamadas no fluxo menstrual atuando no desenvolvimento e manutenção das lesões ectópicas; e 5) um microambiente peritoneal receptivo, hormonal, inflamatório e pró-oxidante (LAGANÀ et al., 2019).

Tendo por base estas informações, adotamos neste trabalho cinco premissas: 1<sup>a</sup>) a teoria da implantação (SAMPSON, 1927); 2<sup>a</sup>) a presença de células-tronco no endométrio (eMSC) e no fluxo menstrual (MenSCs) como possíveis iniciadoras do tecido endometrial ectópico (BOZORGMEHR et al., 2020; GARGETT, 2007; GARGETT; MASUDA, 2010; GARGETT; SCHWAB; DEANE, 2015); 3<sup>a</sup>) associação entre componentes do fluxo menstrual e o estabelecimento da endometriose (BRENNER et al., 2002; CRONA GUTERSTAM et al., 2021; DA SILVA et al., 2014; KUAN et al., 2021); 4<sup>a</sup>) endometriose é uma doença com forte componente genético (GOULIELMOS et al., 2020; KRISHNAMOORTHY; DECHERNEY, 2017; VASSILOPOULOU et al., 2019; ZUBRZYCKA et al., 2020); 5<sup>a</sup>) miRNAs como agentes fisiopatológicos na doença (AZAM et al., 2022; BARANOV; MALYSHEVA; YARMOLINSKAYA, 2018; BJORKMAN; TAYLOR, 2019; KLEMMT; STARZINSKI-POWITZ, 2018; NASU et al., 2022; NOTHNICK, 2017).

#### **4. Teoria da Implantação**

A explicação mais aceita para a maioria dos casos de endometriose pélvica é a teoria da implantação (VINATIER et al., 2001). Acredita-se que pequenos fragmentos de células endometriais viáveis são transportados para a cavidade pélvica durante o fluxo menstrual retrógrado, uma descoberta feita por Sampson em 1927 após observações clínicas e anatômicas (SAMPSON, 1927). Essas células retêm a habilidade de adesão e invasão ao peritônio, podem multiplicar e se diferenciar, originando assim lesões formadas por tecido endometrial funcional (BURNEY; GIUDICE, 2012; WANG; NICHOLAS; SHIH, 2020).

Contudo, esta teoria tem uma contradição importante, que é a ocorrência de menstruação retrógrada em 90% das mulheres em idade reprodutiva (HALME et al., 1984), mas apenas 10% delas desenvolve a doença.

## 5. Células-tronco e Tecido Endometrial Ectópico

Uma hipótese recente propõe que as células-tronco endometriais desempenham papel fundamental na etiopatogenia da endometriose (LIU et al., 2020a; MARUYAMA, 2022). Devido à natureza altamente regenerativa do endométrio, foi proposto por a existência de células com alta capacidade clonogênica, semelhantes a células-tronco mesenquimais (MSC), no endométrio (eMSCs - *endometrial mesenchymal stem cells*) (PRIANISHNIKOV, 1978). Devido às células progenitoras adultas estabelecerem a homeostase tecidual, espera-se que o funcionamento inadequado de eMSCs possa estar relacionado ao início e progressão de afecções ginecológicas relacionadas ao crescimento endometrial anormal, como a endometriose (CHAN; SCHWAB; GARGETT, 2004; GARGETT, 2007).

Uma teoria quanto a etiopatogenia mais contemporânea correlaciona essas células com a etiopatogenia da endometriose (LIU et al., 2020). A presença de células-tronco mesenquimais endometriais no fluxo menstrual (MenSCs) (MENG et al., 2007) e em lesões endometrióticas (CHAN et al., 2011; KAO et al, 2011) já foram evidenciadas, sugerindo que essas células podem ser um fator crítico no estabelecimento e progressão das lesões (GARGETT e MASUDA, 2010; GARGETT et al., 2016).

Até o momento, as atenções têm sido mais direcionadas para eMSCs (BARRAGAN et al., 2016; LIU et al., 2020b; REKKER et al., 2017; SPITZER et al., 2012) do que àquelas presentes no fluxo menstrual (MenSCs) (HWANG et al., 2013; WARREN et al., 2018, p. 20). De modo geral, é descrito que eMSCs são precursoras de fibroblastos do estroma endometrial (BARRAGAN et al., 2016) e que há diferenças sutis na expressão gênica entre as endometrióticas e as controles envolvidos com: controle de degradação proteica, inibição de viabilidade celular, formação de colônias e proliferação celular (BARRAGAN et al., 2016), maior capacidade proliferativa e invasiva e maior expressão de marcadores inflamatórios, como ciclooxigenase-2 (COX-2), (IFN)  $-\gamma$ , interleucina (IL) -10 (NIKOO et al., 2014). Características que podem ser suavizadas com o tempo de exposição à cultura celular, conforme observado pelo nosso grupo (CRESSONI et al., 2023; DE OLIVEIRA et al., 2022; PENARIOL et al., 2022). Tomadas em conjunto tais alterações, acredita-se que as MenSCs são programadas geneticamente para dar origem às lesões ectópicas, além de sofrerem os

possíveis impactos deletérios do fluido peritoneal de mulheres com endometriose (BRAZA-BOÏLS et al., 2013; CAPOBIANCO et al., 2017; COSÍN et al., 2010; MALVEZZI et al., 2019).

## **6. Componentes do fluxo menstrual e a Endometriose**

A menstruação é um processo fisiológico intrincado que ainda possui muitas questões não solucionadas (KUAN et al., 2021). Para entender os possíveis mecanismos etiopatogênicos do microambiente endometrial na endometriose, a avaliação do efluente menstrual é uma alternativa não invasiva em contraposição à biópsia endometrial.

Em um estudo mais recente, em voluntárias saudáveis o perfil de citocinas no plasma sanguíneo menstrual foi determinado e evidenciado um perfil diferente do sangue menstrual quando comparado ao plasma sanguíneo periférico. Altas concentrações de C5/C5a (componente 5 e 5a do complemento humano), IL-6, IL-1 $\beta$  e CXCL8 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 8 (IL-8)) foram detectadas, enquanto baixas concentrações de IL-2, IL-12p70, XCL1/Linfotactina e interferon- $\gamma$  foram encontradas (CRONA GUTERSTAM et al., 2021).

Tendo em vista esse ambiente endometrial inflamatório em condições fisiológicas, espera-se que na condição endometriose isso seja exacerbado, conforme descrito em uma revisão recente da literatura, que uma desregulação no sangue menstrual pode contribuir para a patogênese da endometriose (KUAN et al., 2021). Dentre as alterações mencionadas estão: mediadores inflamatórios, metaloproteinases da matriz endometrial, estresse hipóxico, balanço entre apoptose e proliferação celular, que podem prolongar a sobrevivência de detritos endometriais na cavidade peritoneal e promover a migração e invasão do tecido adjacente. Além disso, foram reportadas altas concentrações de metaloproteinases da matriz e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no sangue menstrual, além de variações em quimiocinas, citocinas e reguladores celulares, como NF $\kappa$ B, prostaglandinas, interleucina-8 (IL-8), ciclooxigenase-2 (COX-2) e peptídeo quimiotático de monócitos-1 (MCP-1) no ambiente perivascular, que podem facilitar a invasão de leucócitos no endométrio (BRENNER et al., 2002). Ainda, a atividade inflamatória local altera marcadores de inflamação e angiogênese no sangue menstrual de mulheres controles e com endometriose, e acentua as atividades de macrófagos e leucócitos das pacientes acometidas pela doença (DA SILVA et al., 2014).

## 7. Componente Genético da Endometriose

Endometriose é uma condição hereditária afetada por múltiplos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (KRISHNAMOORTHY; DECHERNEY, 2017). Estudos familiares, análises de ligação, estudos de associação genética e fenotípica como o GWAS (Genome Wide Association Studies) ajudaram a esclarecer parcialmente a fisiopatologia da doença, com a identificação de *loci* genéticos significativos em todo o genoma, como os 10q26 e 20p13, que afetam o risco de desenvolvimento de endometriose e fornecem novos *insights* sobre os mecanismos envolvidos na doença (VASSILOPOULOU et al., 2019; ZUBRZYCKA et al., 2020). A aplicação de GWAS pode ser útil para diversas finalidades, desde a identificação da causa da doença e esclarecimento de sua patogênese, até a descoberta de novos subtipos e previsão do risco de desenvolvimento da doença, além de proporcionar a identificação de variantes menos comuns com efeitos significativos (VASSILOPOULOU et al., 2019).

Algumas das causas genéticas da endometriose já foram identificadas, como a identificação de genes candidatos, como *CYP2C19*, *INHBA*, *SFRP4*, e *HOXA10* envolvidos com modulação anormal da progressão do ciclo celular, apoptose, adesão, angiogênese, proliferação, processos imunológicos e inflamatórios, resposta à hipóxia, via esteroidogênica e sinalização hormonal, além da identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (ZUBRZYCKA et al., 2020).

## 8. miRNAs e endometriose

Na última década, o número de publicações correlacionando miRNAs à endometriose (BRAZA-BOÏLS et al., 2014; CHEGINI, 2012; HAWKINS et al., 2011; SAARE et al., 2017; SANTAMARIA; TAYLOR, 2014) e a outras doenças do sistema reprodutor feminino aumentou de forma significativa, e foi demonstrado que miRNAs e seus alvos estão desregulados nestas doenças (BJORKMAN; TAYLOR, 2019; NOTHNICK, 2017; PING MU et al., 2016).

Em uma análise integrada do transcriptoma-miRnoma do endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose, foram identificadas as famílias de miRNAs miR-9 e miR-34 como desreguladas, que em análises de enriquecimento mostram-se relacionadas a processos biológicos de morte celular, ciclo celular e montagem e organização celular, vias canônicas de mecanismos moleculares de câncer e regulação do ciclo celular (BURNEY et al., 2009). Bem como em amostras pareadas de endométrio ectópico e eutópico, foram

detectados 84 miRNAs com expressão diferencial significativa, dentre eles miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-182 e miR-202 tiveram a expressão validada por RT-qPCR e os alvos moleculares foram preditos por ferramentas *in silico*, e enriqueceram funções envolvidas na endometriose, como expressão gênica, crescimento e proliferação celular, desenvolvimento celular, movimento celular, morte celular, ciclo celular, câncer e distúrbios do sistema reprodutivo (FILIGHEDDU et al., 2010). Posteriormente, foram revelados 10 microRNAs regulados positivamente e 12 microRNAs regulados negativamente a partir da integração transcriptoma-miRnoma de amostras pareadas de endometriomas e endométrio eutópico. Análises *in silico* predisseram os alvos desses microRNAs e, o miR-29c teve validação funcional em fibroblastos do estroma endometrial humano, associando-se a genes da matriz extracelular (HAWKINS et al., 2011). Esses achados de miRNAs diferencialmente expressos são convergentes para a associação com vias de proliferação celular, morte celular, ciclo celular e mecanismos moleculares de câncer, que podem favorecer o desenvolvimento e a progressão da doença.

Dessa forma, miRNAs parecem ter papel na fisiopatologia da endometriose (BARANOV; MALYSHEVA; YARMOLINSKAYA, 2018; KLEMMT; STARZINSKI-POWITZ, 2018; NASU et al., 2022), evidenciado por perfis distintos de miRNAs (BRAZA-BOÏLS et al., 2013; BURNEY et al., 2009; FILIGHEDDU et al., 2010; HAWKINS et al., 2011; MASHAYEKHI et al., 2019; SAARE et al., 2014, 2017) e mRNA (CHEN et al., 2022; PENARIOL et al., 2022; REKKER et al., 2017, 2018) em amostras endometrióticas e saudáveis, bem como pela discrepância na expressão de transcritos e suas respectivas proteínas em amostras endometrióticas (FASSBENDER et al., 2010, 2012; PRAŠNIKAR et al., 2020; QI et al., 2020; WREN; WU; GUO, 2007).

Tendo em vista a importância dos mecanismos regulatórios dos miRNAs para diversos aspectos da endometriose, bem como a relação entre endometriose e os componentes do fluxo menstrual, é possível que os miRNAs tenham também importante participação em vias gênicas alteradas nas MenSCs da endometriose.

## **9. Achados anteriores do grupo em MenSCs e Hipótese**

Nosso grupo tem buscado por alterações moleculares em diferentes paisagens biológicas ômicas em células-progenitoras descamadas no sangue menstrual, e que possivelmente estão relacionadas ao desenvolvimento da endometriose. Algumas das alterações encontradas foram a superexpressão do miR-200b-3p que pode desencadear



aumento de proliferação celular, conservação de stemness e acentuado processo de transição mesenquimal-epitelial no endométrio eutópico de mulheres com endometriose (DE OLIVEIRA et al., 2022). Também evidenciamos uma diminuição de duas vezes na expressão de *DROSHA*, enzima chave na biossíntese de miRNAs, e sugerimos a identificação na endometriose de diferentes perfis de miRNAs com a biogênese dependente de DROSHA (CRESSONI et al., 2023). Ademais, apresentamos um perfil transcriptômico e proteômico alterado nas MenSCs da endometriose relacionado à vias gênicas alteradas (sinalização PI3K via AKT para mTORC1, sinalização mTORC1, sinalização TGF beta, sinalização TNFA via NFkB, sinalização IL6 STAT3 e resposta à hipóxia via alvos HIF1A) provavelmente como consequência do microambiente endometrial inflamatório crônico característico da doença (PENARIOL et al., 2022).

Portanto, pondera-se que o fluxo menstrual retrógrado conduz MenSCs com alterações primárias na expressão de miRNAs para a cavidade pélvica, que podem participar do desenvolvimento, estabelecimento e manutenção de lesões endometrióticas. Dessa forma, a investigação de mecanismos que esclareçam a expressão e a função de miRNAs relacionados à fisiopatologia da endometriose e o possível papel das MenSCs na doença é de extrema importância para o entendimento da etiopatogenia complexa e multifatorial da endometriose, além de permitir a identificação de alvos moleculares para um diagnóstico menos invasivo ou com aplicações terapêuticas alavancando o conhecimento da doença.

## 10. Justificativa

A endometriose é considerada um problema de saúde pública e sua etiopatogenia ainda é controversa e obscura. Indícios sobre a existência de células-tronco no endométrio e no fluxo menstrual já estão evidenciados na literatura, como: a presença de populações celulares ABCG2+ localizadas exclusivamente no endotélio das camadas basal e funcional (MASUDA et al., 2010; TSUJI et al., 2008); a capacidade de diferenciação das células endometriais Side Population em epiteliais e estromais *in vivo* e *in vitro* (KATO et al., 2007; MASUDA et al., 2010); um número relativamente pequeno de células endometriais humanas dispersas, principalmente da camada funcional, capazes de gerar tecido endometrial composto de glândulas, estroma, células imunes e componentes vasculares quando transplantadas sob cápsula renal de camundongos imunodeficientes (MASUDA et al., 2007); e células-tronco mesenquimais expressarem MCAM e PDGF-R $\beta$  em regiões perivasculares das camadas funcional e basal do endométrio humano (SCHWAB; GARGETT, 2007). Estes

achados levantam a hipótese para uma possível origem do tecido endometrial ectópico e um novo mecanismo na etiopatogenia da endometriose relacionada à participação de células-tronco neste contexto.

Em virtude de as células progenitoras adultas regularem a homeostase tecidual, espera-se que o funcionamento anormal das eMSCs e MenSCs possa estar envolvido no início e progressão de doenças ginecológicas relacionadas à proliferação endometrial anormal, como é o caso da endometriose (GARGETT; CHAN, 2006; GARGETT, 2007).

Sabe-se que existe discordância entre os níveis de expressão de transcritos e os níveis proteicos, processo que tem sido associado com o desenvolvimento de endometriose (WREN; WU; GUO, 2007). Ainda não há na literatura dados sobre rastreamento de miRNA nas MenSCs, e desta forma é desconhecido se uma desregulação pós-transcricional poderia explicar os mecanismos da associação das MenSCs ao processo etiopatogênico da endometriose.

Os endométrios eutópico e ectópico de mulheres com endometriose compartilham alterações que não são encontradas no endométrio de mulheres sem endometriose, o que corrobora com a ideia de que este endométrio alterado, ao cair na cavidade peritoneal, teria potencial inicial para desenvolver a doença (SHARPE-TIMMS, 2001). Nossos achados prévios sugerem que as células-progenitoras descamadas no fluxo menstrual carregam alterações primárias, algumas das quais podem ser explicadas por desregulação pós-transcricional por miRNAs (CRESSONI et al., 2023; DE OLIVEIRA et al., 2022; PENARIOL et al., 2022).

Esforços dedicados à procura de mecanismos para esclarecer a expressão e função de genes relacionados à fisiopatologia da endometriose permitem identificar novos marcadores moleculares para um diagnóstico menos invasivo ou com possíveis aplicações terapêuticas, sendo de suma importância para compreensão desta complexa doença. A tecnologia de sequenciamento *high-throughput* fornece uma poderosa ferramenta para a análise do transcriptoma e traz vantagens sobre métodos convencionais de rastreamento, como os microarrays. As metodologias de sequenciamento para quantificar níveis diferencialmente expressos de transcritos têm custos reduzidos, maior espectro dos transcritos e, conseqüentemente, aumentada capacidade de detectar transcritos raros, isoformas raras de splicing alternativo, no-coding sequences e quantificação direta (dados de contagem) da abundância da transcrição apresentando-se como vantajosa em relação aos *microarrays* (MOROZOVA; HIRST; MARRA, 2009; TARIQ et al., 2011).

Assim, acreditamos que as MenSCs de mulheres com endometriose que descamam durante a menstruação e caem na cavidade peritoneal (susceptível), devido ao fluxo menstrual retrógrado, possuem um perfil de miRNAs alterado.

***OBJETIVOS***

1. Comparar o perfil de expressão de miRNAs de MenSCs obtidas de mulheres saudáveis com as de endometriose;
2. Buscar por processos biológicos ou vias gênicas enriquecidas pelos miRNAs diferencialmente expressos (DEmiRs) que têm funções relacionadas com a etiopatogenia da endometriose

***MATERIAIS E MÉTODOS***

### **Aprovação ética, locais e duração**

*Local.* A expansão das células foi realizada no Centro de Terapia Celular no Hemocentro de Ribeirão Preto da USP. A extração do RNA e as primeiras avaliações de qualidade da amostra foram realizadas no Laboratório Multiusuário do DGO - FMRP/USP. A construção de bibliotecas de RNAs pequenos e a execução do sequenciamento foram realizadas em um prestador de serviços de NGS com expertise em protocolos Illumina miRNA-Seq.

*Aprovação ética.* Esse trabalho foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCRP nº 3644/2019). As MenSCs utilizadas neste estudo foram coletadas, isoladas e caracterizadas de novembro de 2014 a dezembro de 2016 (HCRP nº 15227/2012) e atualmente fazem parte de um biorrepositório da Seção de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia (aprovação ética número HCRP 3644/2019). O consentimento livre e esclarecido foi obtido de todas as participantes envolvidas.

*Duração.* Este estudo caso-controle está sendo realizado desde abril de 2021.

### **Participantes e Critérios de Elegibilidade**

O fluxograma de recrutamento das pacientes (**figura 1**) e a caracterização clínica (**tabela 1**) foram apresentadas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (PENARIOL et al., 2022, figura 1; DE OLIVEIRA et al., 2022, tabela 1). Resumidamente, foram recrutadas mulheres de 18 a 40 anos, com ciclo menstrual eumenorreico, sem uso de medicação anticoncepcional há três meses antes da coleta e sem nenhuma doença sistêmica. Para o grupo caso, foram incluídas 10 mulheres com diagnóstico laparoscópico e histológico de endometriose estágio III/IV de acordo com os critérios definidos pela (ASRM, 1997) e com imagem ultrassonográfica sugestiva de endometrioma prévia a coleta. E para o grupo controle, foram selecionadas 10 pacientes férteis, submetidas a laparoscopia para laqueadura tubária até um ano antes da coleta, dessa forma evidenciando ausência clínica e cirúrgica de endometriose.

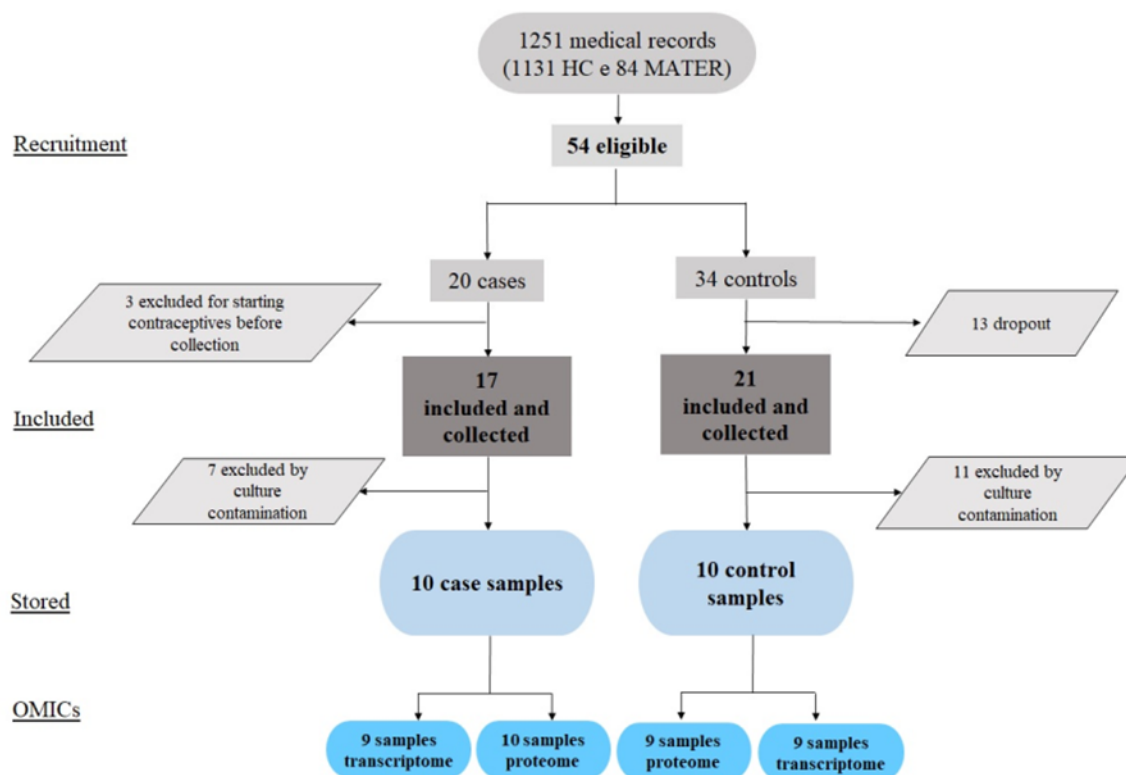


Figure 1. Study flowchart.

Figura 1: Fluxograma de coleta das amostras. Fonte: PENARIOL et al., 2022.

Tabela 1: Dados clínicos das pacientes incluídas no estudo. Fonte: DE OLIVEIRA et al., 2022.

Table 1 Clinical data of women with and without endometriosis

Control	Age (years)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Menstrual cycle day	Endometriosis	Age (years)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Menstrual cycle day	ASRM Classification	USG/ endometrioma	Symptoms
C10	33	23.5	4	E2	39	26.7	3	IV	RO	Inf/pain
C17	39	26.4	3	E3	31	28.1	3	III	LO	Inf/pain
C22	31	29	2	E4	34	25.7	3	IV	RO/LO	Inf/pain
C29	36	28.1	2	E7	33	29.4	4	III	RO	Inf/pain
C31	37	23.2	2	E8	39	24.6	4	IV	LO	Inf/pain
C32	35	25.2	3	E9	34	20.0	2	III	LO	Inf/pain
C34	28	29.2	3	E11	39	23.19	2	III	RO	Inf/pain
C35	37	22.4	3	E12	37	25.51	2	III	LO	Inf/pain
C38	35	26.4	2	E13	39	21.6	2	IV	RO/LO	Inf/pain
C39	39	26.9	3	E27	35	27	2	III	RO	Inf/pain
Median	35.0	26.4	3.0	<b>Median</b>	36.0	25.6	2.5			
p-value	0.590	0.570	0.901							

BMI body mass index, USG ultrasonography, LO left ovary, RO right ovary, Inf infertility. Statistics: Mann-Whitney test (independent samples) and significance  $p$  value < 0.05



### **Amostras armazenadas no biorrepositório**

O protocolo de isolamento das MenSCs armazenadas no biorrepositório foi adaptado de MENG et al., 2007 conforme descrito anteriormente por nosso grupo de pesquisa em ZUCHERATO et al., 2021. Resumidamente, a camada de células mononucleares foi isolada por centrifugação em gradiente de densidade a 800g por 30 min a 22°C com Ficoll-Paque (#71-7167-00AG, GE Healthcare Bio-Sciences, Suécia). As células foram cultivadas em meio essencial  $\alpha$ -mínimo (# 11900-016, Gibco, EUA) com 15% de soro fetal bovino (# SH30071.03, GE Healthcare - HyClone, EUA), 1% de penicilina/estreptomicina (# 15140-122, Gibco, EUA), HEPES 10 mM (# H4034, Merck, EUA) e bicarbonato de sódio 20 mM (# 56297, Merck, EUA). Subcultivamos as células usando solução de tripsina-EDTA a 0,05% (#25300054, Gibco, EUA).

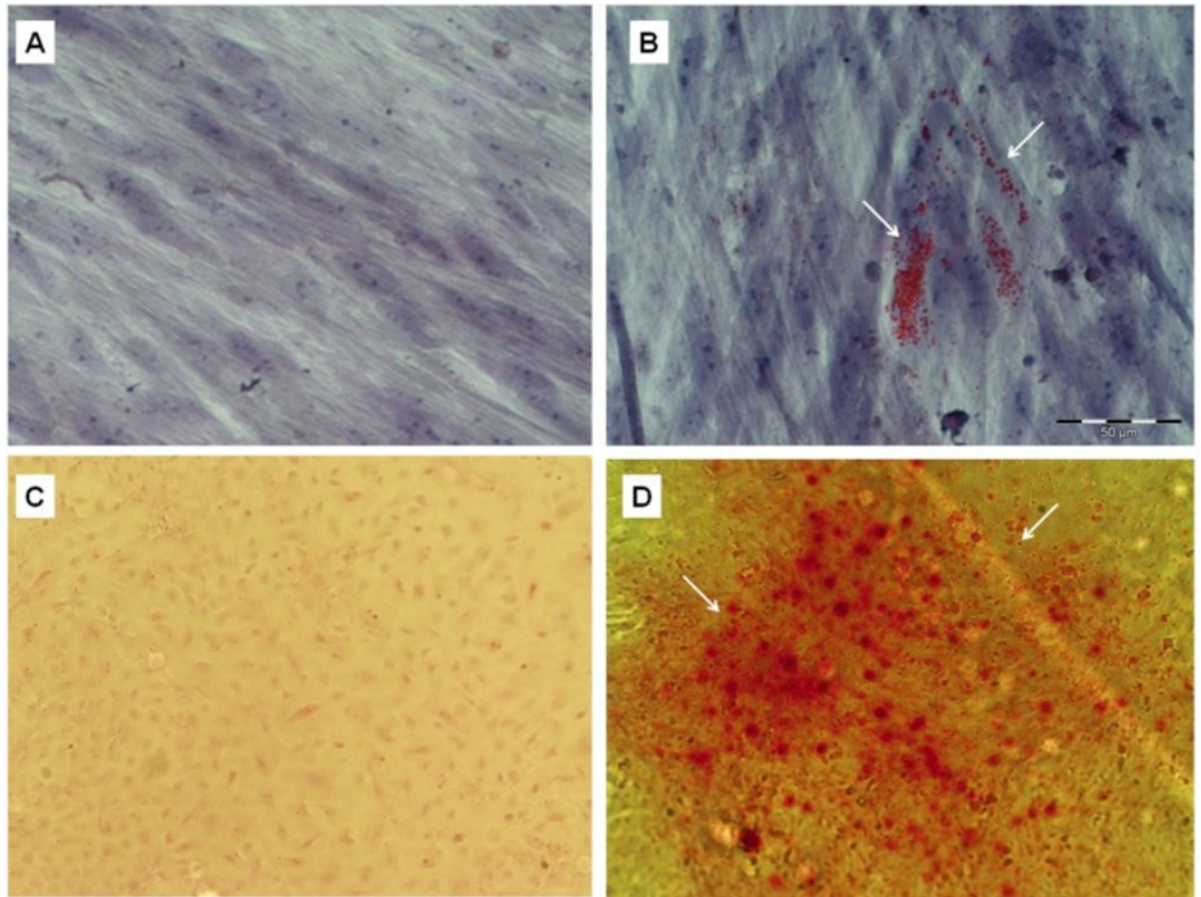
As MenSCs cumprem os critérios mínimos para MSCs multipotentes, conforme definido pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006), dessa forma, foram caracterizadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo para 23 marcadores (**tabela 2**) (DE OLIVEIRA et al., 2022; tabela 2) e foram diferenciadas em adipócitos e osteócitos (**figura 2**) (DE OLIVEIRA et al., 2022, Figura S2).

**Tabela 2:** Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo das MenSCs. **Fonte:** DE OLIVEIRA et al., 2022.

**Table 2** Immunophenotypic profile of MenSCs using the FACSCalibur flow cytometer

Marker	Catalogue number	Supplier	Control (%) N= 10	Endometriosis (%) N= 10	Expression classification	p value
CD45	340040	BD Simultest	0.07 (0.0; 1.3)	0.04 (0; 0.7)	Negative (<2%)	0.208
CD14	555397	BD Pharmingen	0.10 (0.0; 1.6)	0.12 (0.0; 1.0)	Negative (<2%)	0.969
CD34	340430	BD Biosciences	0.01 (0.0; 0.5)	0.28 (0.0; 1.3)	Negative (<2%)	0.104
CD31	555445	BD Biosciences	0.15 (0.0; 1.0)	0.06 (0.0; 0.7)	Negative (<2%)	0.567
EpCAM	324204	BioLegend	0.00 (0.0; 1.0)	0.03 (0.0; 1.9)	Negative (<2%)	0.155
CD106	551146	BD Pharmingen	0.31 (0.0; 1.3)	0.03 (0.0; 0.9)	Negative (<2%)	0.127
HLA-DR	555813	BD Pharmingen	0.05 (0.0; 0.3)	0.00 (0.0; 0.2)	Negative (<2%)	0.148
STRO-1	MAB1038	R&D Systems	0.31 (0.0; 5.0)	0.19 (0.0; 0.2)	Negative (<2%)	0.969
CD51/CD61	555505	BD Pharmingen	6.36 (0.8; 46.0)	7.85 (1.4; 31.3)	Low (2–20%)	0.578
CD146	560846	BD Pharmingen	27.70 (10.5; 58.8)	20.9 (12.0; 63.2)	Medium (20–60%)	0.435
SUSD2	130–106-326	MACS	39.10 (12.0; 70.2)	29.0 (13.2; 68.5)	Medium (20–60%)	0.684
CD140b	558821	BD Pharmingen	56.00 (15; 80.7)	40.40 (19.0; 67.6)	Medium (20–60%)	0.279
CD166	559263	BD Pharmingen	61.50 (42.1; 87.2)	54.70 (22.8; 77.3)	Medium (20–60%)	0.344
HLA-ABC	555552	BD Pharmingen	72.00 (45.5; 92.7)	64.30 (47.5; 83.0)	High (>60%)	0.630
CD44	555478	BD Pharmingen	74.59 (51.4; 87.4)	75.48 (60.5; 87.0)	High (>60%)	0.970
CD49e	555617	BD Pharmingen	82.41 (62.1; 88.9)	76.04 (53.2; 87.6)	High (>60%)	0.190
CD54	555511	BD Pharmingen	87.57 (73.6; 91.9)	82.22 (65.0; 89.4)	High (>60%)	0.123
CD13	557454	BD Pharmingen	88.75 (69.6; 94.5)	88.84 (68.8; 93.5)	High (>60%)	0.850
CD105	560819	BD Pharmingen	71.65 (29.5; 91.49)	67.79 (44.8; 90.8)	High (>60%)	0.909
CD73	550257	BD Pharmingen	86.56 (74.6; 92.5)	84.45 (71.9; 90.4)	High (>60%)	0.472
CD90	555596	BD Pharmingen	93.95 (91.2; 97.9)	93.44 (87.89; 95.8)	High (>60%)	0.190
CD29	559883	BD Pharmingen	95.44 (89.9; 96.4)	94.46 (89.2; 95.5)	High (>60%)	0.140
Control $\gamma$ 1/2a	340041	BD Simultest	—	—	Negative isotype control	

Data presented as median (minimum; maximum). Statistics: Mann–Whitney test (independent samples) and significance  $p$  value <0.05



**Figure S2:** MenSCs were induced to differentiate into (B) adipogenic lineage (highlighted fat vacuoles in adipocytes) and (D) osteogenic lineage (highlighted calcium deposits). A and C are the negative controls (not induced to differentiation).

**Figura 2:** Diferenciação celular das MenSCs em adipócitos e osteócitos. **Fonte:** DE OLIVEIRA et al., 2022.

### **Isolamento, integridade e quantificação de RNA total**

*Extração de RNA total.* O AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (#80224, Qiagen, USA) foi utilizado para a extração do RNA total das MenSCs, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida para remoção de DNA contaminante, o material foi tratado com Ambion DNA-free Kit (#AM1906, Invitrogen, USA).

*Integridade de RNA e quantificação.* A integridade do RNA total foi avaliada no instrumento 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent, USA) utilizando o Agilent RNA 6000 Nano Kit (# 5067-1511, Agilent, USA). Apenas amostras de Número de Integridade de RNA (RIN) igual ou superior a 8 com eletroferogramas compatíveis com RNA íntegro foram

incluídas no estudo. As concentrações totais de RNA foram determinadas por fluorimetria no Fluorômetro Qubit® 2.0 (ThermoFisher, USA) utilizando o Qubit RNA BR Assay Kit (#Q10210, Invitrogen, USA).

## **miRNoma**

*Biblioteca para miRNA-Seq.* As bibliotecas foram construídas usando o TruSeq Small RNA Library Prep Kit (# 15004197, Illumina, EUA) de acordo com as diretrizes do fabricante. O protocolo resume-se às etapas de ligação do adaptador, transcrição reversa, amplificação por PCR e purificação da biblioteca através de gel agrupado. Por fim, para a validação da biblioteca, o tamanho dos fragmentos, pureza e concentração dos pools foram avaliados utilizando o kit Bioanalyzer High Sensitivity DNA (#G2939BA, Agilent® Technologies, EUA). As bibliotecas foram então normalizadas, desnaturadas e diluídas para uma concentração final de 17 pM, prontas para o sequenciamento.

*Clustering e execução.* As bibliotecas geradas foram agrupadas na *flow cell* com reagentes NexSeq 1000/2000 P2 (100 ciclos) v3 usando o equipamento Illumina NextSeq 2000 System. Foi considerado aceitável a obtenção de 10 milhões de leituras por amostra.

*Processamento de dados brutos.* Os dados brutos de leitura (*reads FASTq files*) foram analisados utilizando o *pipeline* nf-core/smrnaseq (PANTANO et al., 2022; disponível em <https://nf-co.re/smrnaseq>) e a expressão diferencial foi obtida no DESeq2 (LOVE et al., 2022; LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Em resumo, o pipeline nf-core/smrnaseq usa FASTQC (ANDREWS, 2010) e MULTIQC (EWELS et al., 2016) para realizar o controle de qualidade das leituras de sequenciamento bruto geradas (FASTq), Trim Galore (KRUEGER et al., 2021) e SeqCluster (PANTANO; ESTIVILL; MARTÍ, 2011) para o pré-processamento dos arquivos através da remoção das sequências adaptadoras e também a remoção de sequências menores do que 17pb e maiores que 40pb, Bowtie1 (LANGMEAD et al., 2021) e genoma humano (GRCh38 - (“GRCh38.p14 - hg38 - Genome - Assembly - NCBI”) compilam hg38 para a etapa de alinhamento de miRNAs maduros e precursores de miRNAs (*hairpins*) e os banco de dados mirtop (DESVIGNES et al., 2020) e miRBase (KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2019) para anotação de miRNAs e isomiRs conhecidos e inéditos.

*Análise de Expressão Diferencial (DEmiRs).* Os arquivos de contagens de miRNAs do pipeline nf-core/smrnaseq, que obteve uma lista dos miRNAs descritos no miRBase e as

respectivas contagens nas amostras analisadas, foi utilizado no pacote DESeq2 R versão 3.16 (LOVE et al., 2022; LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) para realizar a análise de expressão diferencial, baseada no coeficiente de variação entre as duas condições (endometriose versus controle). Foram aplicados os filtros de 50% de alinhamento total, somatório de contagem mínimo de 10 e expressão do miRNA em pelo menos metade das amostras. As análises estatísticas foram realizadas com os valores de contagens brutas usando o pacote estatístico DESeq2 no ambiente R, foi aplicado um teste Wilcoxon e consideramos como DEmiRs os miRNAs que apresentaram p-valor menor que 0.05.

### **Funções biológicas desempenhadas pelos DEmiRs**

*multiMiR*. Para predição da interação miRNA-alvo dos DEmiRs, utilizamos o pacote R multiMiR (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/multiMiR.html>, versão 3.16; RU et al., 2014a, 2014b), que compila dados de bancos externos, como DIANA-microT, ELMMo, MicroCosm, miRanda, miRDB, PicTar, PITA e TargetScan. O *input* foram os miRNAs hsa-miR-1271-5p, hsa-miR-125b-2-3p, hsa-miR-181a-2-3p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-1304-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-337-5p e selecionados os parâmetros: *homo sapiens*, mRNAs alvo preditos e sem alvos definidos.

*Cytoscape*. Os dados gerados pelo multiMiR foram analisados no Cytoscape (<http://www.cytoscape.org>, versão 3.9.1) para construção da rede de interação molecular e integração dos perfis diferenciais de expressão de genes e de miRNAs (SHANNON et al., 2003).

*WebGestalt (WEB-based Gene Set Analysis Toolkit)*. Utilizamos a ferramenta WebGestalt (<https://www.webgestalt.org/>, versão 2019) para análise de enriquecimento funcional dos genes regulados pelos DEmiRs (LIAO et al., 2019). Os dados gerados pelo Cytoscape foram filtrados a partir dos graus de centralidade 4 a 7, ou seja, 4 ou mais miRNAs regulando o mesmo alvo, e foram utilizados para análise de enriquecimento funcional. Os parâmetros básicos aplicados foram: *Homo sapiens* como organismo de interesse, Over-Representation Analysis (ORA) como método de interesse, *pathways* bancos de dados funcional KEGG e Reactome. Para a lista de genes selecionados, o símbolo do gene foi utilizado como tipo de ID e inserimos a lista proveniente da análise do MultiMiR. Selecionamos também o genoma como lista de genes de referência.

### Validação quantitativa do miR-1271-5p por RT-qPCR

*RT-qPCR.* Quantificamos a expressão do miR-1271-5p, um dos DEmiRs obtido pela análise do miRnoma, por RT-qPCR, utilizando o sistema TaqMan Advanced miRNA assay (cat. A25576, Applied Biosystems, EUA). As reações de corrida foram realizadas em triplicata para 10 amostras caso e 10 controles, sob as seguintes condições: 5 µL de 2X TaqMan Fast Advanced Master Mix (#4444557, Applied Biosystems), 0,5 µL de 20X TaqMan Advanced miRNA assay (cat. A25576, Applied Biosystems), 2,5 µL de cDNA-pre-amp diluído 1:10 e 2 µL de água livre de nucleases, totalizando, 10 µL de volume final de reação. As condições de ciclagem aplicadas foram 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 20 segundos, 40 ciclos de 1 segundo a 95 °C e 20 segundos a 60 °C no equipamento ViiA Real-Time PCR System (Applied Biosystem, EUA). Consideramos aceitáveis as réplicas técnicas com a diferença máxima entre os valores de Cq (quantificação de ciclos) para até 0,3 ciclos. Foi incluído em todas as placas um controle negativo, no qual foi adicionado água livre de nucleases ao invés da amostra, não houve amplificação (Cq = indetectável). Além disso, avaliamos a eficiência de amplificação (E%) de todas as sondas utilizadas através de uma curva-padrão com 8 pontos em diluição seriada 1:2 de um pool de cDNA-pré-amp de todas as amostras, sendo o primeiro ponto da curva diluído a 1:16. Selecionamos a concentração 1:32 para esse estudo. O software do próprio equipamento foi utilizado para o cálculo da E%, conforme a recomendação do fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2006), foram consideradas como aceitáveis E% entre 90 e 110%.

*Nível de expressão relativa (RQ).* O nível de (RQ) para o miRNA analisado foi calculado para cada amostra de acordo com o método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) utilizando o Thermo Fisher Connect Platform® disponível online (<http://www.thermofisher.com/br/en/home/digital-science/thermo-fisher-connect.html>). Um *pool* de cDNA das amostras controle foi utilizado para o cálculo de normalização dos dados como a amostra de referência.

*Sondas de hidrólise.* As sondas de hidrólise TaqMan Gene Expression Assays (#4331182, Thermo FisherA) utilizadas foram: hsa-miR-1271-5p (Assay ID: 478674\_mir), como alvo, e hsa-miR-191-5p (477952\_mir), hsa-miR-24-3p (477992\_mir), e hsa-miR-103a-3p (478253\_mir), como genes de referência, escolhidos com base na maior estabilidade apresentada em MenSCs (HACIMOTO et al., 2023).

*Análises estatísticas.* As análises foram realizadas usando o SAS Statistical Software (versão 9.4; SAS Institute, Inc. Cary, NC, EUA). Inicialmente, testes de homogeneidade de

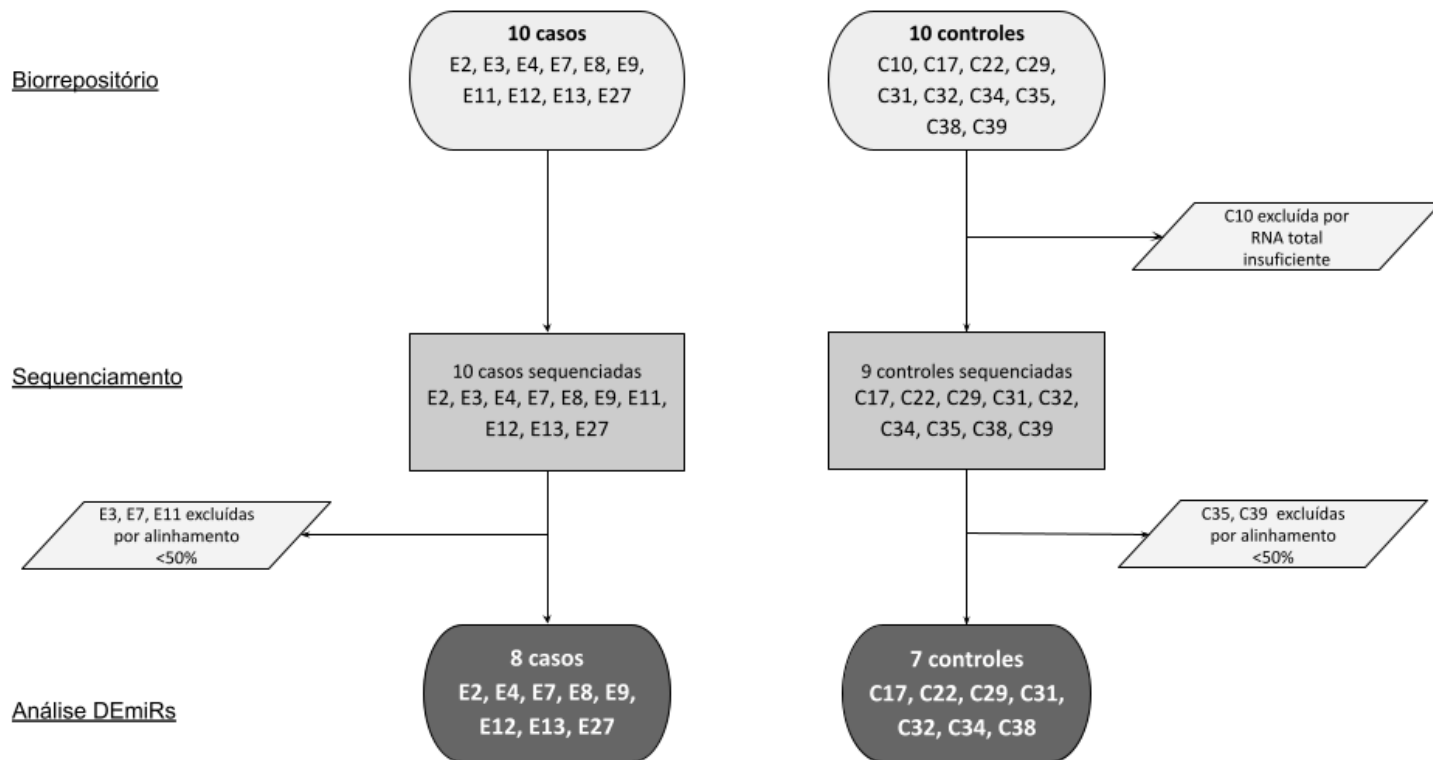
variâncias e distribuição de frequência de resíduos foram realizados por meio de histogramas e testes em PROC UNIVARIATE (SAS Inc., Cary, NC, EUA). A transformação logarítmica dos dados RQ foi desnecessária, pois as suposições de linearidade foram atendidas. O teste  $t$  para amostras independentes foi aplicado de acordo com os procedimentos do General Linear Model para comparar os valores médios de RQ ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) entre os grupos controle e endometriose. Os valores médios de RQ foram usados para calcular a mudança na expressão gênica no grupo controle em relação ao grupo caso. Os parâmetros de significância foram  $\alpha=0,05$ , poder do teste  $(1-\beta)$  foi de pelo menos 0,8 e  $d$  de Cohen=0,4.

***RESULTADOS***

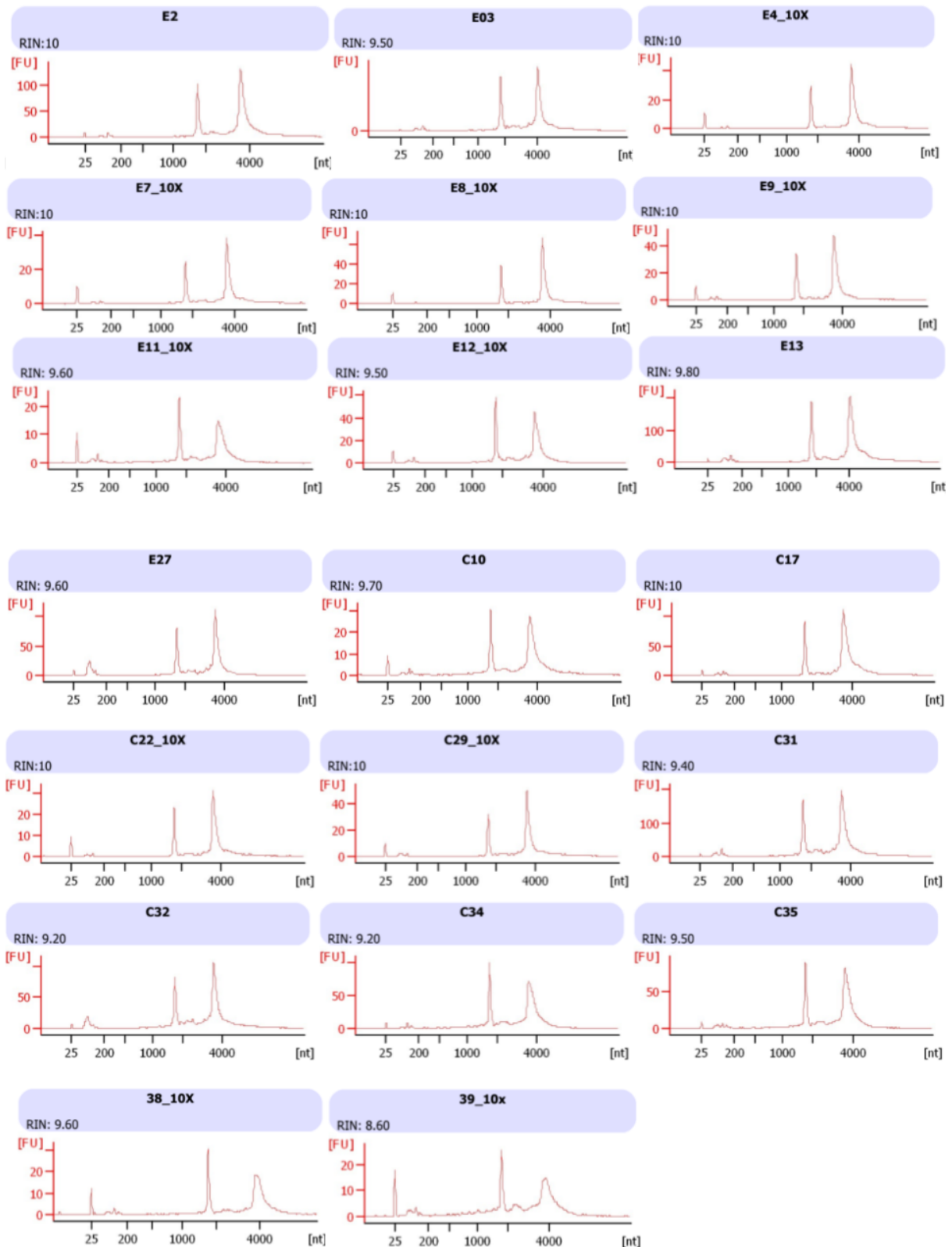


### **Fluxo de trabalho do estudo**

Na **figura 3** está representado o fluxo de trabalho do estudo, onde 10 amostras de MenSCs por grupo (casos: E2, E3, E4, E7, E8, E9, E11, E12, E13, E27 e controles: C10, C17, C22, C29, C31, C32, C34, C35, C38, C39) foram selecionadas inicialmente para esse estudo. Todas as amostras passaram pelo controle de qualidade e integridade de RNA, pois apresentaram RIN maior do que 8 (**figura 4**). No entanto, só foi possível realizar o miRNA-Seq de 19 amostras, uma vez que uma das amostras controle (C10) foi excluída por não apresentar a concentração de RNA total mínima recomendada no protocolo de confecção das bibliotecas (200 ng/mL). Após a execução dos protocolos de NGS e análise de qualidade dos dados brutos gerados foram incluídas nas análises de expressão diferencial (DEmiRs) 8 amostras casos e 7 controles, assim 4 amostras foram excluídas das análises estatísticas e de enriquecimento funcional por não terem atingido pelo menos 50% de alinhamento com o genoma base. Para as análises de RT-qPCR foram incluídas as 10 amostras por grupo.



**Figura 3:** Fluxograma do estudo



**Figura 4:** Os eletroferogramas das amostras foram obtidos com a aplicação do Agilent 2100 Bioanalyzer e RNA 600 Nano kit. O Número de Integridade do RNA (RIN) foi realizado usando o software Agilent 2100 Expert B.02.07.SI532. C: controle; E: endometriose.

## miRNoma

*Processamento de dados brutos.* Um resumo dos resultados gerados pelo MultiQC é apresentado na **tabela 3**. Três amostras do grupo caso (E3, E7, E11) e duas controles (C39, C35) foram excluídas das análises de expressão diferencial por não apresentarem porcentagem de alinhamento suficiente (<50%).

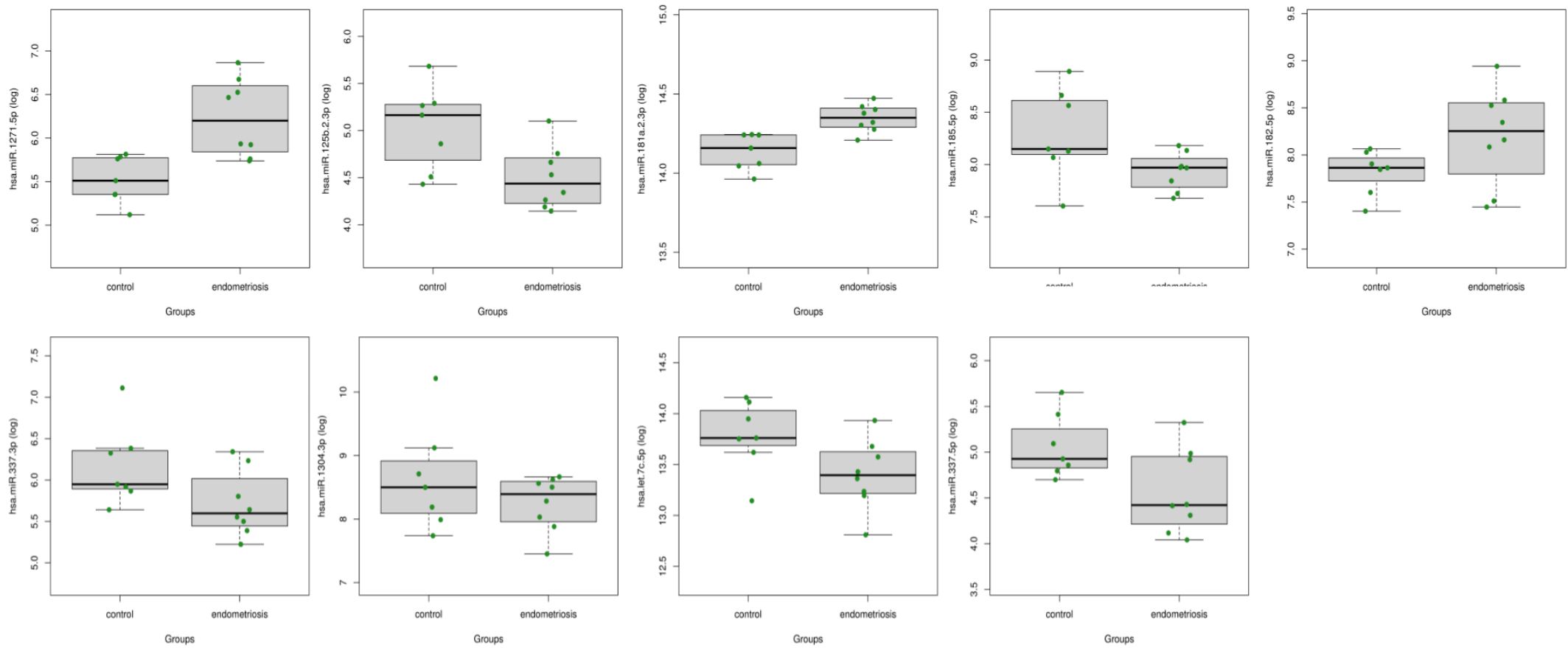
**Tabela 3:** Resultados obtidos no MultiQC para cada amostra sequenciada quanto aos milhões de leituras mapeadas, porcentagem de mapeamento e total de sequências

Amostra	Leituras Mapeadas (milhões)	% Mapeada	Total de Sequências FastQC (milhões)
C17	4.1	66,8	6.1
C22	3.8	67,0	5.6
C29	3.3	65,3	4.9
C31	5.8	71,4	8.0
C32	4.3	74,0	5.8
C34	2.6	60,5	4.2
C35	1.9	46,0	4.0
C38	3.2	57,3	5,6
C39	2.3	47,5	4.8
E11	3.6	41,4	8.7
E12	3.6	56,9	6.3
E13	4.6	65,3	6.9
E27	6.2	72,4	8.4
E2	3.6	65,6	5.4
E3	3.1	45,9	6.8
E4	2.8	69,8	3.9
E7	3.3	55,0	5.9
E8	3.7	69,3	5.3
E9	4.0	67,8	5.8

*Análise de Expressão Diferencial.* Após as análises de alinhamento e contagem dos dados brutos obtidos no NGS, foram encontrados 1491 miRNAs maduros com anotações no banco de dados do miRBase, e que após a aplicação dos filtros (50% de alinhamento total, somatório de contagem mínimo de 10 reads e expressão em pelo menos 50% das amostras) restaram 378 miRNAs que foram destinados às análises de expressão diferencial pelo DESeq2 no ambiente R. Consideramos como diferencialmente expressos (DEmiRs), 9 miRNAs com valor de  $p < 0,05$  (tabela 4 e figura 5), sendo o miR-1271-5p o único DEmiR com p-valor ajustado menor que 0,05 (p-ajuste 0,021).

**Tabela 4:** DEmiRs

<b>miRNA</b>	<b>log2FoldChange</b>	<b>p-valor</b>	<b>p-adj</b>
hsa-miR-1271-5p	1.39	5,58E+09	0.0210
hsa-miR-125b-2-3p	-1.15	0.0052	0.9851
hsa-miR-181a-2-3p	0.33	0.0085	0.9851
hsa-miR-185-5p	-0.69	0.0122	0.9851
hsa-miR-182-5p	0.77	0.0189	0.9851
hsa-miR-337-3p	-0.89	0.0252	0.9851
hsa-miR-1304-3p	-1.02	0.0308	0.9851
hsa-let-7c-5p	-0.61	0.0313	0.9851
hsa-miR-337-5p	-0.92	0.0375	0.9851

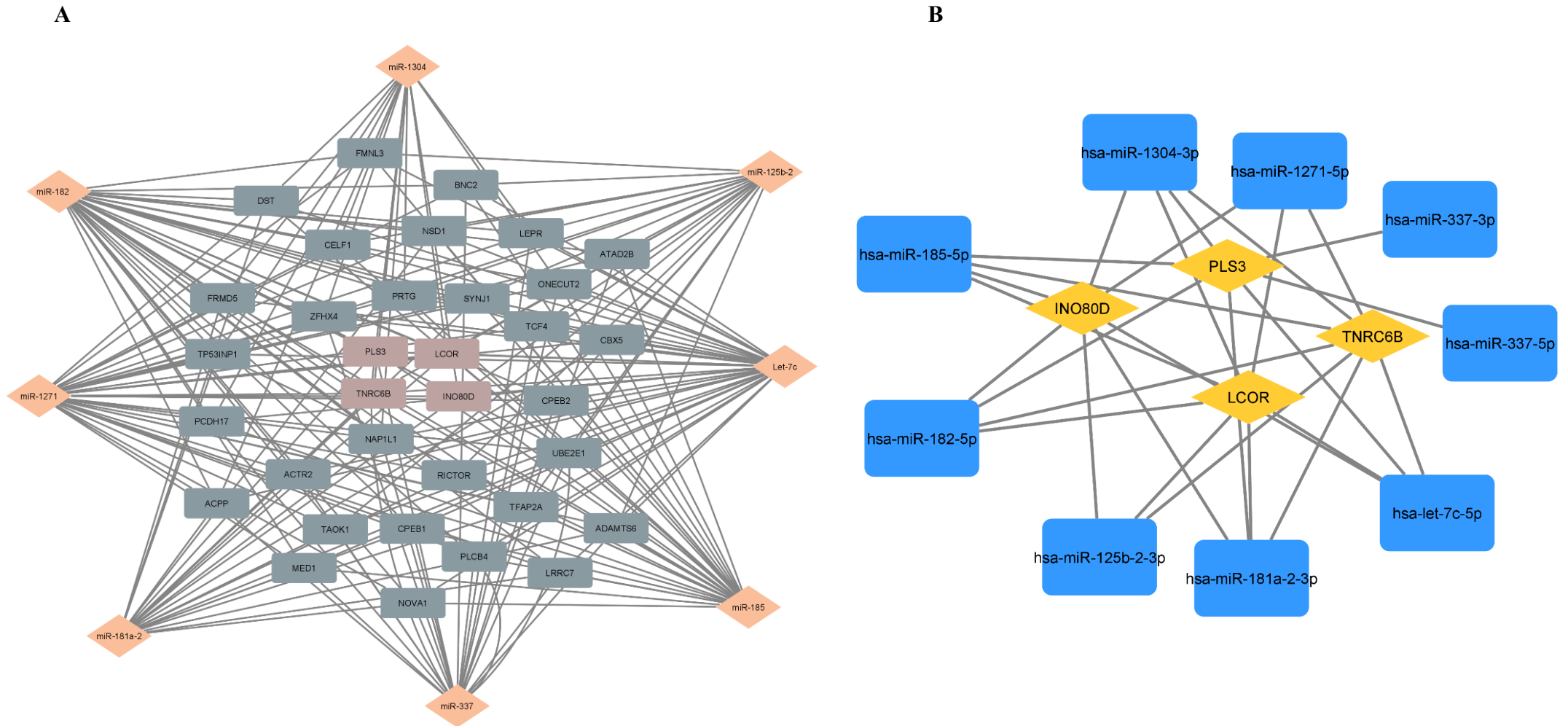


**Figura 5:** Boxplots representativos da expressão dos DE miRNAs em cada grupo.

### Funções biológicas desempenhadas pelos DEmiRs

*multiMiR*. Os 9 miRNAs com significância estatística têm como alvos preditos 8139 mRNAs. Todas as interações miRNA-alvo podem ser observadas na **tabela suplementar 1** (disponível em: <https://drive.google.com/drive/folders/1wWQkRayf8zemiPf43aWyqRFB8pAOXR68?usp=sharing>).

*Cytoscape*. A rede de interação molecular miRNA-alvo gerada pelo Cytoscape com graus de centralidade 6 e 7, ou seja 6 ou 7 miRNAs regulando o mesmo mRNA, pode ser visualizada na **figura 6A**. Pode-se observar 42 nós (8 miRNAs e 34 mRNAs) e 208 arestas (interações). Também, buscamos na literatura quais dos 34 genes-alvo dos DEmiRs haviam sido relacionados à endometriose, e encontramos 82% dos genes (28) já explorados na doença (**tabela 5**). Além disso, apresentamos na **figura 6B** a rede de interação miRNA-alvo com 7 graus de centralidade, na qual 4 mRNAs (*LCOR*, *PLS3*, *INO80D*, *TNRC6B*) são regulados pelos miRNAs hsa-let-7c-5p, hsa-miR-125b-2-3p, hsa-miR-1271-5p, hsa-miR-1304-3p, hsa-miR-181a-2-3p, hsa-miR-182-5p e hsa-miR-185-5p.



**Figura 6:** Rede de interação molecular miRNA-alvo gerada pelo Cytoscape. A: Interações para os graus de centralidade 6 e 7. Os miRNAs são representados por losangos laranjas e os mRNAs por retângulos cinza e marrom. B: Interações para o grau de centralidade 7. Os miRNAs são representados retângulos azuis e os mRNAs por losangos amarelos.



**Tabela 5:** Revisão de literatura sobre os genes regulados pelos DEmiRs (graus de centralidade 6 e 7) em endometriose

<b>Gene</b>	<b>DOI</b>
<i>LCOR</i>	<a href="https://doi.org/10.21873/invivo.12545">https://doi.org/10.21873/invivo.12545</a> <a href="https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.08.060">https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.08.060</a>
<i>PLS3</i>	<a href="https://doi.org/10.11606/D.5.2019.tde-04092019-081458">https://doi.org/10.11606/D.5.2019.tde-04092019-081458</a> <a href="https://doi.org/10.1155%2F2010%2F369549">https://doi.org/10.1155%2F2010%2F369549</a> <a href="https://livrepository.liverpool.ac.uk/id/eprint/6273">https://livrepository.liverpool.ac.uk/id/eprint/6273</a>
<i>INO80D</i>	<a href="https://doi.org/10.1093%2Fhumrep%2Fdez279">https://doi.org/10.1093%2Fhumrep%2Fdez279</a>
<i>TNRC6B</i>	NA
<i>CPEB1</i>	<a href="https://doi.org/10.1089/dna.2021.1017">https://doi.org/10.1089/dna.2021.1017</a>
<i>PRTG</i>	<a href="https://patents.google.com/patent/US20160251718A1/en">https://patents.google.com/patent/US20160251718A1/en</a>
<i>RICTOR</i>	<a href="https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2018.3967#">https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2018.3967#</a> <a href="https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120805">https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120805</a> <a href="https://www.mdpi.com/1422-0067/23/7/3416">https://www.mdpi.com/1422-0067/23/7/3416</a>
<i>TP53INP1</i>	<a href="https://www.mdpi.com/1422-0067/23/9/4660">https://www.mdpi.com/1422-0067/23/9/4660</a>
<i>ACTR2</i>	<a href="https://patents.google.com/patent/US20160251718A1/en">https://patents.google.com/patent/US20160251718A1/en</a> <a href="https://doi.org/10.1177%2F1933719110386241">https://doi.org/10.1177%2F1933719110386241</a> <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028214003124">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028214003124</a>
<i>BNC2</i>	<a href="https://doi.org/10.1093/humrep/der169">https://doi.org/10.1093/humrep/der169</a> <a href="https://doi.org/10.3389%2Ffimmu.2022.1037504">https://doi.org/10.3389%2Ffimmu.2022.1037504</a> <a href="https://openarchive.ki.se/xmlui/handle/10616/40412">https://openarchive.ki.se/xmlui/handle/10616/40412</a> <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.02.022">http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.02.022</a>
<i>MED1 (MBD4)</i>	<a href="https://doi.org/10.3389/fphar.2022.932526">https://doi.org/10.3389/fphar.2022.932526</a>
<i>ONECUT2</i>	<a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/icmm.16039">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/icmm.16039</a>
<i>CBX5</i>	<a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028213034675">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028213034675</a>

---

<i>DST</i>	<a href="https://doi.org/10.1210%2Fen.2014-1490">https://doi.org/10.1210%2Fen.2014-1490</a>
<i>NAPILI</i>	<a href="https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.058">https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.058</a>
<i>CELF1</i>	<a href="https://doi.org/10.3390%2Fbiom10091311">https://doi.org/10.3390%2Fbiom10091311</a>
<i>CPEB2</i>	NA
<i>LEPR (OB-R)</i>	<a href="https://doi.org/10.1093/molehr/gah115">https://doi.org/10.1093/molehr/gah115</a> <a href="https://doi.org/10.1093/molehr/8.5.456">https://doi.org/10.1093/molehr/8.5.456</a> <a href="https://doi.org/10.1155%2F2013%2F879618">https://doi.org/10.1155%2F2013%2F879618</a>
<i>ADAMTS6</i>	<a href="https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.082867">https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.082867</a>
<i>FRMD5</i>	<a href="https://doi.org/10.1186%2Fs12958-017-0319-5">https://doi.org/10.1186%2Fs12958-017-0319-5</a>
<i>LRRC7</i>	NA
<i>PLCB4</i>	<a href="https://doi.org/10.7717%2Fpeerj.8730">https://doi.org/10.7717%2Fpeerj.8730</a> <a href="https://doi.org/10.1210/en.2006-1692">https://doi.org/10.1210/en.2006-1692</a> <a href="https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.020">https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.020</a> <a href="https://doi.org/10.1002/ijc.31768">https://doi.org/10.1002/ijc.31768</a> <a href="http://dx.doi.org/10.7717/peerj.11045">http://dx.doi.org/10.7717/peerj.11045</a> <a href="https://doi.org/10.1016/j.vgyno.2013.04.267">https://doi.org/10.1016/j.vgyno.2013.04.267</a>
<i>ZFHX4</i>	<a href="https://doi.org/10.3390%2Fijms20081842">https://doi.org/10.3390%2Fijms20081842</a> <a href="https://doi.org/10.3892%2Fetm.2019.8214">https://doi.org/10.3892%2Fetm.2019.8214</a> <a href="https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.037">https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.037</a> <a href="https://doi.org/10.1093/humrep/dez155">https://doi.org/10.1093/humrep/dez155</a>
<i>PCDH17</i>	<a href="https://doi.org/10.1093/humrep/den078">https://doi.org/10.1093/humrep/den078</a> <a href="https://doi.org/10.3390%2Fijms22147297">https://doi.org/10.3390%2Fijms22147297</a> <a href="https://doi.org/10.1038/s41467-022-33982-7">https://doi.org/10.1038/s41467-022-33982-7</a>
<i>TCF4</i>	<a href="https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.058">https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.058</a>

---

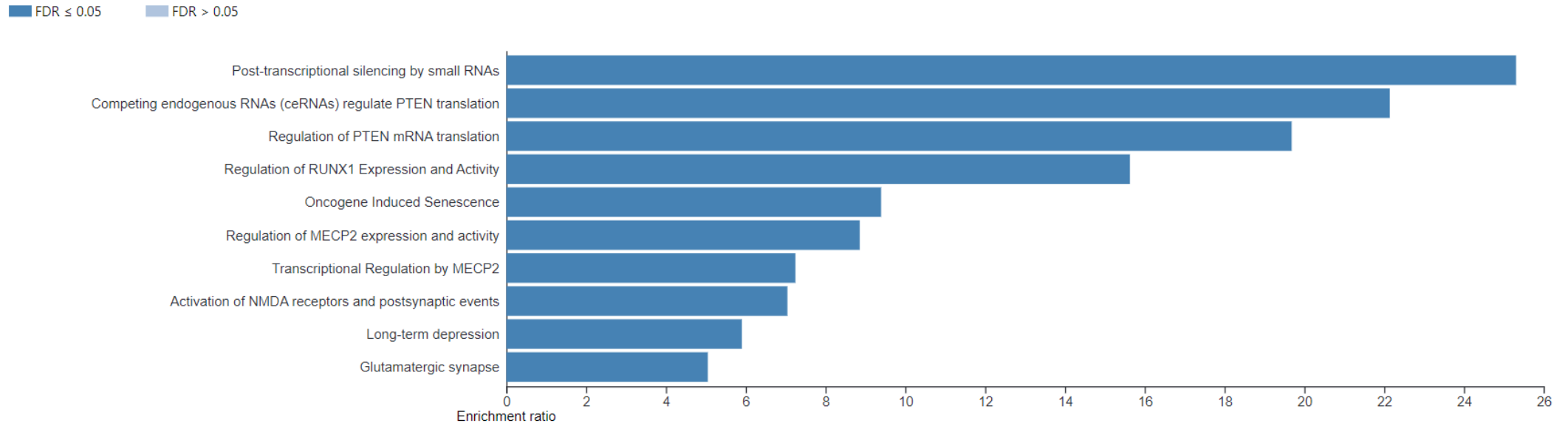
---

	<a href="https://doi.org/10.1101/2021.05.20.445037">https://doi.org/10.1101/2021.05.20.445037</a>
<i>NOVA1</i>	NA
<i>UBE2E1</i>	<a href="https://doi.org/10.1177/1933719116641761">https://doi.org/10.1177/1933719116641761</a>
<i>ATAD2B</i>	NA
<i>TFAP2A</i>	NA
<i>SYNJI</i>	<a href="https://doi.org/10.4103%2F0366-6999.240808">https://doi.org/10.4103%2F0366-6999.240808</a>
<i>FMNL3</i>	<a href="https://doi.org/10.1177%2F1933719117704905">https://doi.org/10.1177%2F1933719117704905</a>
	<a href="https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.086">https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.086</a>
<i>ACPP</i>	<a href="https://patents.google.com/patent/US20160251718A1/en">https://patents.google.com/patent/US20160251718A1/en</a>
	<a href="https://doi.org/10.1210%2Fen.2014-1490">https://doi.org/10.1210%2Fen.2014-1490</a>
	<a href="https://doi.org/10.1177%2F1933719117704905">https://doi.org/10.1177%2F1933719117704905</a>
	<a href="https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.086">https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.086</a>
<i>TAOK1</i>	<a href="https://doi.org/10.1155%2F2015%2F340218">https://doi.org/10.1155%2F2015%2F340218</a>
<i>NSD1</i>	<a href="https://doi.org/10.3390%2Fcells10040749">https://doi.org/10.3390%2Fcells10040749</a>

---

*WebGestalt*. A análise de enriquecimento funcional miRNA-alvo global foi gerada no Webgestalt, sendo construída a partir de 8139 genes, desses, 3050 estão anotados para as categorias funcionais selecionadas e também na lista de referência e foram utilizados para as análises de enriquecimento e foram identificadas 136 categorias enriquecidas com  $FDR < 0,05$ , das quais as 40 primeiras vias (top 40) estão representadas na **figura suplementar 1**, e todas as vias enriquecidas podem ser encontradas na **tabela suplementar 2** (disponível em: <https://drive.google.com/drive/folders/1wWQkRayf8zemiPf43aWyqRFB8pAQXR68?usp=sharing> ). Estringindo as análises de enriquecimento funcional miRNA-alvo para os graus de centralidade 4 a 7, construímos a partir de 438 genes, desses, 265 foram utilizados para as análises e foram identificadas 10 categorias enriquecidas com  $FDR < 0,05$  (**figura 7**).

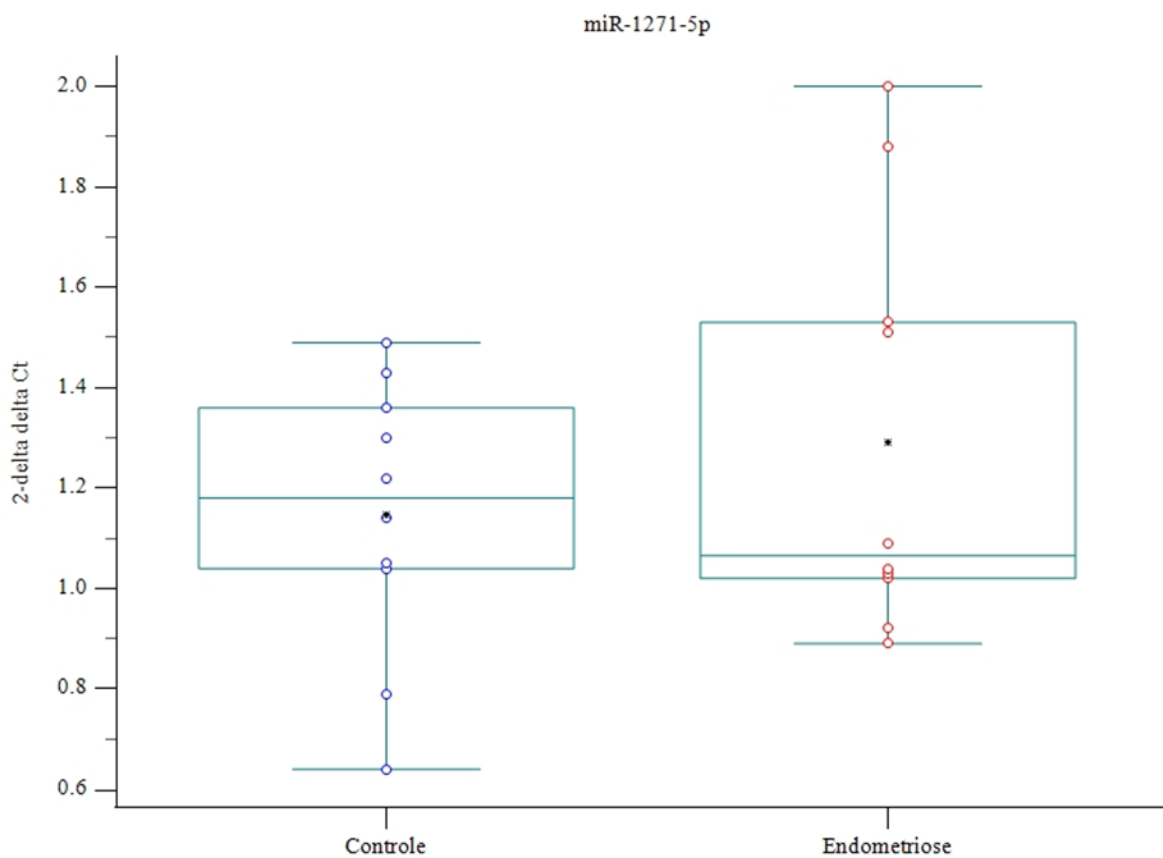




**Figura 7:** Vias enriquecidas com 265 genes no Webgestalt para os graus de centralidade de 4 a 7 determinados no Cytoscape.

### Avaliação da expressão do miR-1271-5p por RT-qPCR

Todas as sondas utilizadas no experimento de quantificação da expressão gênica apresentam eficiências de amplificação entre 90 e 110%, dentro do recomendado pela empresa, sendo para hsa-miR-1271-5p de 91.11%, hsa-miR-191-5p de 93.33%, hsa-miR-24-3p de 91.33%, e hsa-miR-103a-3p de 93.58%. Não foi observada diferença significativa na expressão do miR-1271-5p alvo, não sendo possível a validação dos resultados do miRNoma (**Figura 8**).



**Figura 8:** Boxplots e pontos representativos dos valores de Ct para o miR-1271-5p. A caixa representa os valores de quartil mínimo (Q1 - 25º percentil) e máximo (Q3 - 75º percentil). A linha horizontal dentro da caixa representa a mediana. O mínimo [ $Q1 - (1.5 * IQR)$ ] e o máximo [ $Q3 + (1.5 * IQR)$ ] estão representados por whiskers. A distribuição das amostras é representada por círculos. O ponto preto representa o valor da média. IQR= intervalo interquartil (interquartile range). O box-plot foi criado utilizando o MedCalc Statistical Software versão 19.5.1 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020).

*DISCUSSÃO*

Estudos de abordagens multi-ômicas em MenSCs na condição de endometriose são escassos, sendo nosso grupo de pesquisa o pioneiro ao descrever o perfil integrado do transcriptoma e do proteoma dessas células (PENARIOL et al., 2022). Almejando entender agora os mecanismos regulatórios pós-transcricionais nestas células, apresentamos aqui a primeira análise exploratória do miRNoma de MenSCs, e destacamos nove miRNAs com expressão diferencial (hsa-miR-1271-5p, hsa-miR-125b-2-3p, hsa-miR-181a-2-3p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-1304-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-337-5p). Também identificamos através de análises in silico vias e genes regulados por testes DEmiRs que possivelmente estão relacionados à mecanismos moleculares alterados na endometriose. Os genes *LCOR*, *PLS3*, *INO80D*, *TNRC6B* são regulados por pelo menos sete destes miRNAs, sendo três genes já estudados na doença e estão envolvidos com vias celulares de: silenciamento pós-transcricional por pequenos RNAs, RNAs endógenos concorrentes (ceRNAs) reguladores da tradução do PTEN, regulação da tradução do mRNA do PTEN, regulação da expressão e atividade da RUNX1, senescência induzida por oncogene, regulação da expressão e atividade de MECP2, regulação da transcrição por MECP2, ativação de receptores NMDA e eventos pós-sinápticos, long-term depression e sinapse glutamatérgica que, quando desreguladas, podem ser cruciais para a etiopatogenia da endometriose.

### **1. Silenciamento pós-transcricional por pequenos RNAs**

O envolvimento de miRNAs com a etiopatogenia da endometriose é amplamente explorado (BRAZA-BOÏLS et al., 2014; CHEGINI, 2010; HAWKINS et al., 2011; KOLANSKA et al., 2021; OHLSSON TEAGUE et al., 2009; SAARE et al., 2017; SANTAMARIA; TAYLOR, 2014), reforçado pelo desequilíbrio na expressão de transcritos e suas respectivas proteínas em amostras endometrióticas (FASSBENDER et al., 2010, 2012; PRAŠNIKAR et al., 2020; QI et al., 2020; WREN; WU; GUO, 2007).

A via canônica de biossíntese de miRNAs envolve a transcrição do miRNA pela Polimerase II, na forma de hairpin, o qual é processado pelo microprocessador, composto por DROSHA e DGCR8, o pré-miRNA é exportado para o citoplasma através da EXP5 (HA; KIM, 2014). No citoplasma ocorre a clivagem mediada por DICER1, que resulta no pequeno RNA dupla fita, que após a ligação a uma das argonautas (AGO1-4) forma o complexo RISC (RNA-induced silencing complex), responsável pelo emparelhamento de bases com o mRNA (HA; KIM, 2014). Caso o emparelhamento seja total haverá a clivagem do mRNA, enquanto que no caso de emparelhamento incompleto haverá bloqueio da tradução, resultando em diminuição da expressão e em última instância ambos alteram o perfil proteico expresso (HA; KIM, 2014).



Ademais, a via de biossíntese de miRNAs também pode ser regulada por miRNAs, processo que se dá através da regulação negativa das proteínas atuantes na biogênese, como DROSHA, DICER1, AGO1-4, mecanismo de atuação já descrito para a família let-7 (HA; KIM, 2014). Dessa forma, o enriquecimento da via de silenciamento pós-transcricional por pequenos RNAs demonstra um mecanismo regulatório e compensatório, no qual os DE miRs podem atuar nas MenSCs tanto a nível de regulação de genes que afetam o desenvolvimento da endometriose, quanto em sua via de biossíntese, sabidamente desregulada nesse tipo celular (CRESSONI et al., 2023).

## **2. Os RNAs endógenos concorrentes (ceRNAs) reguladores da tradução do PTEN e regulação da tradução do mRNA do PTEN**

O gene supressor tumoral *PTEN* é assunto de intensa investigação na biologia tumoral devido à perda de função frequentemente observada em cânceres hereditários e esporádicos (LEE; CHEN; PANDOLFI, 2018). É codificante de uma fosfatase conversora de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato em fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, sendo antagonista da via de sinalização altamente oncogênica de PI3K/Akt (LI et al., 1997), é responsável também por regular diferentes processos biológicos, como a manutenção da estabilidade genômica, sobrevivência celular, migração, proliferação e metabolismo (LEE; CHEN; PANDOLFI, 2018). Seu equilíbrio é finamente regulado, qualquer pequena alteração em sua atividade resulta em susceptibilidade ao câncer e induz a progressão tumoral, mutações somáticas estão associadas à doença avançada, resistência a quimioterapia e baixa sobrevida (VIDOTTO et al., 2023). O declínio de função pode ocorrer por perda hemizigótica que resulta na redução da expressão gênica ou por perda homozigótica, levando à ausência de expressão (LEE; CHEN; PANDOLFI, 2018).

A expressão gênica de *PTEN* também pode ser regulada em nível pós-transcricional, através de RNAs codificantes e não codificantes que podem impedir a ligação de miRNAs ao mRNA, denominados RNAs endógenos concorrentes (ceRNAs) (TAY et al., 2011). Transcritos do pseudogene *PTENP1* e mRNAs transcritos dos genes *SERINC1*, *VAPA* e *CNOT6L* exibem essa atividade (TAY; RINN; PANDOLFI, 2014).

Embora haja indícios de que a endometriose apresente potencial maligno, atualmente a compreensão sobre os mecanismos moleculares que levam à transformação maligna da endometriose é limitada (MA et al., 2016). Nesse contexto, o estudo do PTEN pode trazer indícios de como a transformação ocorre.

Na endometriose, é descrita a coexistência de perda total de *PTEN* e hiperatividade de MAPK/ERK, PI3K/Akt e NFκB no endométrio eutópico e ectópico, sendo a perda homozigótica observada em endometrioses estágio III e IV e a perda hemizigótica nos estágios I, II, III e IV, sugerindo associação entre a diminuição de expressão de *PTEN* e estadio da doença (ZHANG et al., 2010). É descrito um alça de *feedback* positivo entre o 17β-estradiol e NFκB, PTEN e PI3K, que pode promover a proliferação de células epiteliais endometriais ectópicas e contribuir para a progressão das lesões (ZHANG et al., 2010).

Processo que na endometriose poderia ser acentuado devido a característica estrogênio-dependente (KITAWAKI et al., 2002).

Há maior consenso ao sugerir que a diminuição da expressão de *PTEN* parece ser um evento precoce na via de desenvolvimento do tumor a partir de lesões endometrióticas (AKBARZADEH-JAHROMI et al., 2020), sendo evidenciado pela coexistência de carcinomas ginecológicos e endometriose (MARTINI et al., 2002).

Já os ceRNAs tem aplicação na identificação de alvos potenciais para estudos de mecanismos etiopatogênicos e potenciais biomarcadores de endometriose, como descrito por XIE; YIN; LIU (2022) que estabeleceram uma rede de ceRNA composta por 30 miRNAs reguladores dos genes *ACLY*, *ADH1B*, *PTGFR*, e *MYOMI*. E também, WANG; YU (2019) que identificaram uma rede de ceRNAs composta por *DRAIC*, *LOC400867*, hsa-miR-449c-5p e hsa-miR-449a, associados à endometriose e envolvidos com vias de decidualização, via de sinalização do VEGF, via de sinalização do TNF e esteroidogênese ovariana.

Apesar de ceRNAs reguladores do *PTEN* ainda não terem sido explorados, levando em consideração a similaridade entre endometriose e câncer endometrial, como estímulo do estrogênio e inflamação crônica (YU et al., 2015), tais estruturas mostram-se interessantes objetos de estudo futuro para identificação de como a transformação maligna pode ocorrer e o envolvimento do *PTEN* nesse processo.

### 3. Regulação da expressão e atividade da *RUNX1*

*RUNX1* é o gene codificador do fator de transcrição 1 relacionado ao Runt (*RUNX1*), relacionado à geração de células-tronco hematopoiéticas e na sua diferenciação em linhagens mieloides e linfoides, e a perda da função muitas vezes resulta no desenvolvimento de leucemias (SOOD; KAMIKUBO; LIU, 2017). Sua expressão é controlada por dois promotores, o distal P1 e o proximal P2, e suas isoformas são geradas a partir do uso deles e de splicing alternativo, as derivadas de P2 são expressas em vários tecidos e a isoforma derivada de P1 é restrita a células da linhagem hematopoiética (MARTINEZ et al., 2016). Ademais, sua expressão também é autorregulada, através de um alça de feedback positivo em células hematopoiéticas, nas quais a proteína *RUNX1* é recrutada para seu próprio promotor, regulando a transcrição do gene *RUNX1*, mecanismo chave para especificação e diferenciação celular (LIE-A-LING et al., 2018).

*RUNX1* parece estar envolvido com o desenvolvimento de endometriose ovariana (WANG et al., 2020), sendo altamente regulado por fatores de transcrição já estabelecidos no desenvolvimento de doença, como receptor androgênico, receptores de estrogênio  $\alpha$  e  $\beta$ , *FOXA2* e *TFAP2C* (YANG et al., 2015). O que também já foi demonstrado em modelo experimental, no qual o nível de *RUNX1* mostra-se 12 vezes aumentado, que pode resultar em transdução de sinal em células imunológicas e inflamatórias, induzindo a produção de citocinas e quimiocinas (KONNO et al., 2007). Dessa forma, *RUNX1* pode ter envolvimento na etiopatogenia da endometriose ao contribuir com o microambiente inflamatório característico (WU; HSIAO; TSAI, 2015), além de seu papel intrínseco na especificidade e diferenciação celular, que pode alterar o comportamento de MenSCs, favorecendo o estabelecimento de lesões.

Outra função desempenhada pelo *RUNXI* e ainda não explorada na endometriose é a capacidade de determinar o fenótipo sensorial nociceptivo neuronal, sendo necessário para transdução de estímulos para dor térmica e neuropática, ao regular a expressão de canais iônicos e receptores, como o receptor opioide MOR (CHEN et al., 2006). Explorar tal mecanismo na endometriose seria interessante devido a existência de dor neuropática em algumas pacientes (COXON; WIECH; VINCENT, 2021), além da compreensão de como uma possível alteração de expressão do receptor opioide MOR poderia impactar o tratamento de dor, que muitas vezes se dá através de opioides (GUAN et al., 2023).

#### 4. Senescência induzida por oncogene

A senescência induzida por oncogene (OIS) é um mecanismo antiproliferativo ativado por sinalização pró-oncogênica (CHANDECK; MOOI, 2010). Inicialmente, acreditava-se que a OIS fosse um processo de controle da transformação maligna, no entanto, ela também desempenha papel no início e desenvolvimento de tumores (LIU; DING; MENG, 2018). Isso ocorre porque a senescência persistida pode criar um microambiente inflamatório propício à tumorigênese, principalmente devido ao fenótipo celular secretor associado à senescência (SASP) (LIU; DING; MENG, 2018). Essas células secretam fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas, metaloproteinases de matriz e proteases que interagem com as células vizinhas não senescentes, promovendo proliferação, sobrevivência, angiogênese e metástase (LIU; DING; MENG, 2018).

Eventos oncogênicos vem sendo estudados na endometriose, e a OIS não é diferente. A senescência parece ser fundamental para a receptividade embrionária em células-tronco do estroma endometrial, em pacientes não receptivas as culturas primárias dessas células apresentaram mais células senescentes e com SASP (TOMARI et al., 2020). Não é conhecido se esse efeito é observado em MenSCs, deveria ser elucidado em detalhes no futuro para melhor compreensão de infertilidade associada à endometriose.

A presença da mutação oncogênica no gene *KRAS* em lesões endometrióticas, mesmo na ausência de sinais de câncer, indica que as células endometrióticas podem ser mais resistentes à OIS do que as células normais (VESTERGAARD et al., 2011). Essa característica pode ajudar a explicar por que as lesões de endometriose têm potencial à carcinogênese, e avaliar mutações no *KRAS* em MenSCs permitiria verificar se a potencial é pré-determinado geneticamente ou é um evento tardio, que decorre do estabelecimento das lesões endometrióticas.

WANG et al., 2022 ao avaliar marcadores de senescência e transição epitélio-mesenquimal (EMT) células epiteliais de lesões ectópicas descreve diminuição de expressão de E-caderina e aumento de vimentina, processo característico da EMT, além da superexpressão de *SIRT1*, que pode ser o gatilho para EMT e escape da OIS. Já os genes  *$\beta$ -galactosidase*, *p16* e *MAPK*, responsáveis pela comunicação entre as vias de senescência e EMT, têm expressão diminuída em lesões ectópicas em relação ao endométrio eutópico (WANG et al., 2022). Também, é descrita diminuição na expressão de Lamin b1 e aumento de p16, Ink4 e IL-1 $\beta$  em lesões de endometriose profunda e um meio pró-inflamatório nas lesões e no endométrio eutópico, mediado pelo SASP, sugerindo que parte das células

endometrióticas estejam entrando em estado de senescência (MALVEZZI et al., 2022), o que é estimulado pelo estresse oxidativo na cavidade peritoneal (MALVEZZI et al., 2023).

Esses achados juntamente com as alterações de transcritos, de miRNAs e de proteínas em MenSCs, descritas anteriormente (DE OLIVEIRA et al., 2022; PENARIOL et al., 2022), que conferem conservação de *stemness* e ocorrência transição mesenquimal-epitelial no endométrio, características que podem indicar um perfil transitório entre o endométrio eutópico e o ectópico, nos permitem hipotetizar que o processo de senescência induzida por oncogene participe da etiopatogenia da endometriose, seja pela manutenção de células programadas geneticamente para a formação de lesões ou pela promoção de um microambiente inflamatório propício à tumorigênese.

## 5. Regulação da expressão e atividade de MECP2 e regulação de transcrição por MECP2

O gene *MECP2* é codificador da proteína MECP2, é um importante regulador transcricional (CHAHROUR et al., 2008). Identifica metilações no DNA através de seu domínio de ligação metil-CpG, promove a condensação da cromatina ao formar um complexo com as histonas desacetilases (HDAC) ou bloquear diretamente a ligação de fatores de transcrição (YASUI et al., 2007). Seu *locus* gênico está localizado no cromossomo X e a perda de função está relacionada à maioria dos casos de síndrome de Rett, uma condição neurológica progressiva que afeta o desenvolvimento e é uma das principais causas de deficiência cognitiva em mulheres (AMIR et al., 1999). MECP2 é essencial para atividades de células nervosas, como maturação do sistema nervoso central e formação de sinapses, além de modular a plasticidade sináptica e o comportamento (EBERT et al., 2013; LUIKENHUIS et al., 2004).

A expressão de MECP2 e outros reguladores epigenéticos já foi avaliada na condição endometriose. KAAM et al., 2011 avaliou endométrios na fase proliferativa de pacientes saudáveis e com endometriose, e após o tratamento com 17 $\beta$ -estradiol e progesterona, os níveis de expressão de MECP2 foram menores na endometriose, porém a expressão é restabelecida nas lesões. Tendo em vista o papel exercido pela MECP2 no crescimento e diferenciação endometrial, a expressão variada ao longo do ciclo menstrual e a consequente capacidade reduzida de decidualização e implantação (KAAM et al., 2011), questiona-se a importância das MenSCs nesse contexto, que poderiam também estarem alteradas e dessa forma permanecerem indiferenciadas, que ao serem carregadas pelo fluxo menstrual retrógrado e sofrerem modulação pelo fluido peritoneal poderiam dar origem às lesões ectópicas.

MECP2 é capaz também de regular a expressão de miRNAs, através da ligação a DGCR8 e impedir a formação do complexo microprocessador (DROSHA-DGCR8) e a consequente síntese do miRNA (CHENG et al., 2014). Um dos miRNAs afetados por esse processo é o miR-199a, que regula a expressão de mTOR em neurônios com fenótipo Rett (TSUJIMURA et al., 2015). Descrevemos anteriormente que MenSCs endometrióticas apresentam expressão de *DROSHA* reduzida, que pode alterar a expressão de miRNAs que dependem dela para a biossíntese (CRESSONI et al., 2023), e também que a via de

sinalização PI3K/AKT/mTORC1 está alterada (PENARIOL et al., 2022). Tendo em vista esses achados, permite-se questionar se MECP2 acentuaria a expressão alterada de miRNAs e ativação da via PI3K/AKT/mTORC1 e poderia favorecer processos de proliferação celular que levariam ao desenvolvimento da endometriose.

## **6. Ativação de receptores NMDA e eventos pós-sinápticos**

Os receptores NMDA (NMDAR) são canais ionotrópicos de glutamato, com alta permeabilidade ao cálcio e são fundamentais para o desenvolvimento do sistema nervoso central, processos de memória, aprendizagem e neuroplasticidade, uma vez que regulam a plasticidade funcional e estrutural de sinapses, dendritos e neurônios individuais, permitindo a ativação de cascatas de sinalização dependentes de cálcio específicas (BLANKE; VANDONGEN, 2009). Em uma série de condições patológicas e transtornos neurológicos tais receptores apresentam alterações nos níveis de expressão e de função, a perda de função leva a defeitos cognitivos e a hiperestimulação causa excitotoxicidade e subsequente neurodegeneração (BLANKE; VANDONGEN, 2009).

A endometriose não é exceção a isso. É conhecido que esse distúrbio altera a eletrofisiologia do sistema nervoso em camundongos (LI et al., 2018). Está associada a uma mudança na excitabilidade da substância cinzenta periaquedutal ventral em ratas, estrutura associada à analgesia, regulação autonômica e comportamentos defensivos, através de alterações na expressão de receptores opióides MOR e NMDAR, que pode resultar em hiperalgesia (TORRES-REVERÓN et al., 2016). E também, roedores fêmeas com dor associada à endometriose apresentam alterações funcionais no córtex cingulado anterior, hipocampo e tálamo, como a hiperexpressão de TRPV-1 e NMDAR, aumento no número de neurônios apoptóticos e alterações na estrutura celular, o que pode refletir maior plasticidade neuronal nessas áreas do cérebro, resultando em amplificação e memória da dor (ZHENG et al., 2020).

Ademais, é de conhecimento que sob condições de dor crônica, há ativação de NMDAR na medula espinhal, podendo resultar no aumento persistente da dor por meio da produção de óxido nítrico e/ou prostaglandinas (WIERTELAK et al., 1994). E que mulheres com dor pélvica crônica secundária a endometriose apresentam maiores níveis plasmáticos de óxido nítrico (ROCHA et al., 2015).

Sendo assim, o enriquecimento da via de ativação de receptores NMDA e eventos pós-sinápticos em MenSCs nos permite hipotetizar que as alterações neurofisiológicas observadas em pacientes com endometriose e associadas a processos nociceptivos parecem ser determinadas molecularmente e enriquecidas pelo óxido nítrico, contribuindo para a origem das lesões endometrióticas e a ocorrência de dor pélvica crônica.

## **7. Long-term depression**

A depressão de longa duração (LTD) é um mecanismo de plasticidade sináptica, caracterizado pela diminuição duradoura na eficiência da transmissão, processo fundamental para codificação de novas informações (PURVES et al., 2001). Pode ser desencadeada pela

ativação sináptica ou farmacológica de receptores de glutamato, como NMDARs, e receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) (COLLINGRIDGE et al., 2010).

A LTD especificamente, ainda não foi explorada na condição endometriose, mas devido às alterações eletrofisiológicas encontradas no sistema nervoso em camundongos com endometriose induzida (LI et al., 2018), mostra-se um alvo interessante de investigação, uma vez que pode estar envolvida com analgesia, amplificação e memória da dor através do estímulo de NMDARs, e poderia permitir a identificação de potenciais alvos terapêuticos e melhora nos tratamentos farmacológicos atuais.

## **8. Sinapse glutamatérgica**

Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central, é precursor do neurotransmissor inibitório ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), além de ser essencial para o metabolismo intermediário e síntese proteica (BAK; SCHOUSBOE; WAAGEPETERSEN, 2006). Quando liberado na fenda sináptica atua em receptores ionotrópicos de glutamato pós-sinápticos (iGluRs), mediando uma transmissão sináptica excitatória rápida; pode atuar também em receptores metabotrópicos (mGluRs) e exercer efeitos modulatórios dependentes de segundos mensageiros consequente do acoplamento às proteínas G (FRENGUELLI, 2022). Após a ação em seus receptores é removido da fenda sináptica por astrócitos circundantes, onde é transformado em glutamina, liberado no espaço extracelular e convertida novamente em glutamato por neurônios no terminal pré-sináptico (BAK; SCHOUSBOE; WAAGEPETERSEN, 2006).

Através da liberação prolongada de sinais de neurocinas que sensibilizam os neurônios adjacentes, causando uma inflamação neurogênica, as células da glia podem contribuir para o desenvolvimento de dor persistente, ao contribuírem para o desenvolvimento de inflamação periférica (DODDS et al., 2016). Ademais, mediadores pró-inflamatórios derivados da glia, como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  aumentam a sinalização nociceptiva na medula espinhal, facilitando a neurotransmissão glutamatérgica (DODDS et al., 2016).

É descrito que em modelos animais de endometriose há ativação glial em todo o sistema nervoso central (BASHIR et al., 2023). E que pacientes com dor pélvica crônica associada à endometriose exibem neurotransmissão glutamatérgica aprimorada na ínsula anterior e no córtex pré-frontal medial, principais regiões de processamento da dor neural (AS-SANIE et al., 2016). Esses resultados podem auxiliar na compreensão do componente de sensibilização central da dor pélvica crônica associada à endometriose. Além disso, o enriquecimento da via de sinalização de sinapse glutamatérgica em MenSCs pode dar indícios que esse componente seja geneticamente modulado na doença.

### **Pontos fortes e limitações do estudo**

Os pontos fortes de nosso estudo são o uso de critérios de elegibilidade rigorosos para a obtenção de amostras biológicas mais homogêneas possíveis. Apesar disso, nesse estudo

piloto, nosso tamanho amostral não permitiu a validação de expressão diferencial do miR1271-5p por RT-qPCR, sendo necessário a validação de nossos achados em casuística maiores que a nossa. Outro ponto a ser considerado é a análise de expressão gênica após o cultivo celular, que pode alterar o ambiente celular e atenuar as diferenças sutis encontradas, no entanto, as técnicas mais comumente utilizadas para o isolamento de células-tronco mesenquimais são a aderência ao plástico, capacidade de diferenciação em adipócitos e osteócitos e citometria de fluxo positiva para os marcadores celulares CD105, CD90 e CD73 (DOMINICI et al., 2006), tornando impossível ignorar os processos de cultivo *in vitro*.

De maneira geral, as vias enriquecidas pelo miRnoma propõe alterações moleculares pós-transcricionais nas MenSCs, e nos fazem questionar uma possível função dessas células progenitoras na etiopatogenia da endometriose nos âmbitos de: sensibilização central da dor pélvica crônica, proliferação celular acentuada ativada pelo eixo MECP2/PI3K/AKT/mTORC1, intensificação do microambiente inflamatório, diferenciação celular, além potencializar aspectos de malignidade das lesões. Adicionalmente, nossos resultados podem direcionar a identificação de desafios e oportunidades para investigações de mecanismos funcionais nas MenSCs, bem como, contribui para a promoção do conhecimento acerca do papel das células-tronco mesenquimais na etiopatogenia da endometriose.

***CONCLUSÕES***



1. Nesse estudo piloto do miRnoma de MenSCs, relatamos nove miRNAs com expressão diferencial (hsa-miR-1271-5p, hsa-miR-125b-2-3p, hsa-miR-181a-2-3p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-1304-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-337-5p).
2. Os genes *LCOR*, *PLS3*, *INO80D*, *TNRC6B* são regulados por pelo menos sete dos DEmiRs e são alvos para desenhos experimentais futuros sobre mecanismos funcionais nas MenSCs na endometriose.
3. Destacamos através de ferramentas *in silico* os processos biológicos: silenciamento pós-transcricional por pequenos RNAs, RNAs endógenos concorrentes (ceRNAs) reguladores da tradução do PTEN, regulação da tradução do mRNA do PTEN, regulação da expressão e atividade da RUNX1, senescência induzida por oncogene, regulação da expressão e atividade de MECP2, regulação da transcrição por MECP2, ativação de receptores NMDA e eventos pós-sinápticos, long-term depression e sinapse glutamatérgica, que foram enriquecidos pelas interações miRNAs-alvos e possivelmente relacionados com a etiopatogenia da endometriose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKBARZADEH-JAHROMI, M. et al. Evaluation of PTEN and Ki67 Expression in Typical and Atypical Endometriosis and Endometriosis Associated Ovarian Cancer. **Shiraz E-Medical Journal**, v. 21, n. 11, 2020.
- AMIR, R. E. et al. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. **Nature Genetics**, v. 23, n. 2, p. 185–188, out. 1999.
- ANDREWS, S. **FastQC: A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Online]**. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 10 set. 2022.
- ASRM. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. **Fertility and Sterility**, v. 67, n. 5, p. 817–821, maio 1997.
- AS-SANIE, S. et al. Functional connectivity is associated with altered brain chemistry in women with endometriosis-associated chronic pelvic pain. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, v. 17, n. 1, p. 1–13, jan. 2016.
- AZAM, I. N. A. et al. Roles of microRNAs in Regulating Apoptosis in the Pathogenesis of Endometriosis. **Life**, v. 12, n. 9, p. 1321, 26 ago. 2022.
- BAEK, D. et al. The impact of microRNAs on protein output. **Nature**, v. 455, n. 7209, p. 64–71, 4 set. 2008.
- BAK, L. K.; SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. **Journal of Neurochemistry**, v. 98, n. 3, p. 641–653, ago. 2006.
- BARANOV, V.; MALYSHEVA, O.; YARMOLINSKAYA, M. Pathogenomics of Endometriosis Development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1852, 23 jun. 2018.
- BARRAGAN, F. et al. Human Endometrial Fibroblasts Derived from Mesenchymal Progenitors Inherit Progesterone Resistance and Acquire an Inflammatory Phenotype in the Endometrial Niche in Endometriosis. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 5, p. 118, maio 2016.
- BASHIR, S. T. et al. Endometriosis leads to central nervous system-wide glial activation in a mouse model of endometriosis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 20, n. 1, p. 59, 6 mar. 2023.
- BJORKMAN, S.; TAYLOR, H. S. MicroRNAs in endometriosis: biological function and emerging biomarker candidates†. **Biology of Reproduction**, v. 100, n. 5, p. 1135–1146, 1 maio 2019.
- BLANKE, M. L.; VANDONGEN, A. M. J. Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. Em: VAN DONGEN, A. M. (Ed.). **Biology of the NMDA Receptor**. Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2009.
- BOZORGMEHR, M. et al. Endometrial and Menstrual Blood Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Biological Properties and Clinical Application. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 497, 9 jul. 2020.
- BRAZA-BOÏLS, A. et al. Peritoneal Fluid Reduces Angiogenesis-Related MicroRNA Expression in Cell Cultures of Endometrial and Endometriotic Tissues from Women with Endometriosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e62370, 19 abr. 2013.
- BRAZA-BOÏLS, A. et al. MicroRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. **Human Reproduction**, v. 29, n. 5, p. 978–988, 1 maio 2014.
- BRENNER, R. M. et al. Premenstrual and menstrual changes in the macaque and human endometrium: relevance to endometriosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 955, p. 60–74; discussion 86–88, 396–406, mar. 2002.
- BURNEY, R. O. et al. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 10, p. 625–631, out. 2009.
- BURNEY, R. O.; GIUDICE, L. C. Pathogenesis and Pathophysiology of Endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 98, n. 3, p. 10.1016/j.fertnstert.2012.06.029, set. 2012.
- BUSHATI, N.; COHEN, S. M. microRNA Functions. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 1, p. 175–205, 2007.
- CAPOBIANCO, A. et al. The peritoneum: healing, immunity, and diseases. **The Journal of Pathology**, v. 243, n. 2, p. 137–147, out. 2017.
- CATALANOTTO, C.; COGONI, C.; ZARDO, G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An

- Overview of Nuclear Functions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1712, 13 out. 2016.
- CHAHROUR, M. et al. MeCP2, a Key Contributor to Neurological Disease, Activates and Represses Transcription. **Science (New York, N.Y.)**, v. 320, n. 5880, p. 1224–1229, 30 maio 2008.
- CHAN, R. W. S.; SCHWAB, K. E.; GARGETT, C. E. Clonogenicity of Human Endometrial Epithelial and Stromal Cells1. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 6, p. 1738–1750, 1 jun. 2004.
- CHANDECK, C.; MOOI, W. J. Oncogene-induced cellular senescence. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 17, n. 1, p. 42–48, jan. 2010.
- CHEGINI, N. Uterine microRNA signature and consequence of their dysregulation in uterine disorders. **Animal Reproduction**, v. 7, n. 3, p. 117–128, jul. 2010.
- CHEGINI, N. Uterine microRNA signature and consequence of their dysregulation in uterine disorders. p. 17, 2012.
- CHEN, C.-C. et al. Transcriptome Profiling of Eutopic and Ectopic Endometrial Stromal Cells in Women with Endometriosis Based on High-Throughput Sequencing. **Biomedicines**, v. 10, n. 10, p. 2432, 29 set. 2022.
- CHEN, C.-L. et al. Runx1 Determines Nociceptive Sensory Neuron Phenotype and Is Required for Thermal and Neuropathic Pain. **Neuron**, v. 49, n. 3, p. 365–377, 2 fev. 2006.
- CHENG, T.-L. et al. MeCP2 suppresses nuclear microRNA processing and dendritic growth by regulating the DGCR8/Drosha complex. **Developmental Cell**, v. 28, n. 5, p. 547–560, 10 mar. 2014.
- COLLINGRIDGE, G. L. et al. Long-term depression in the CNS. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 459–473, jul. 2010.
- COSÍN, R. et al. Influence of peritoneal fluid on the expression of angiogenic and proteolytic factors in cultures of endometrial cells from women with endometriosis. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 25, n. 2, p. 398–405, fev. 2010.
- COXON, L.; WIECH, K.; VINCENT, K. Is There a Neuropathic-Like Component to Endometriosis-Associated Pain? Results From a Large Cohort Questionnaire Study. **Frontiers in Pain Research**, v. 2, p. 743812, 4 nov. 2021.
- CRESSONI, A. C. L. et al. Downregulation of DROSHA: Could It Affect miRNA Biogenesis in Endometriotic Menstrual Blood Mesenchymal Stem Cells? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5963, 22 mar. 2023.
- CRONA GUTERSTAM, Y. et al. The cytokine profile of menstrual blood. **Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica**, v. 100, n. 2, p. 339–346, fev. 2021.
- DA SILVA, C. M. et al. Identification of local angiogenic and inflammatory markers in the menstrual blood of women with endometriosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 68, n. 7, p. 899–904, set. 2014.
- DE OLIVEIRA, R. Z. et al. Overexpression of miR-200b-3p in Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells from Endometriosis Women. **Reproductive Sciences**, v. 29, n. 3, p. 734–742, mar. 2022.
- DESVIGNES, T. et al. Unification of miRNA and isomiR research: the mirGFF3 format and the mirtop API. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 36, n. 3, p. 698–703, 1 fev. 2020.
- DODDS, K. N. et al. Glial contributions to visceral pain: implications for disease etiology and the female predominance of persistent pain. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 9, p. e888–e888, set. 2016.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 1 jan. 2006.
- EBERT, D. H. et al. Activity-dependent phosphorylation of MeCP2 threonine 308 regulates interaction with NCoR. **Nature**, v. 499, n. 7458, p. 341–345, jul. 2013.
- EWELS, P. et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics**, v. 32, n. 19, p. 3047–3048, 1 out. 2016.
- FASSBENDER, A. et al. TRIzol treatment of secretory phase endometrium allows combined proteomic and mRNA microarray analysis of the same sample in women with and without endometriosis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 123, dez. 2010.
- FASSBENDER, A. et al. Combined mRNA microarray and proteomic analysis of eutopic endometrium of women with and without endometriosis. **Human Reproduction**, v. 27, n. 7, p. 2020–2029, jul. 2012.

- FILIGHEDDU, N. et al. Differential Expression of MicroRNAs between Eutopic and Ectopic Endometrium in Ovarian Endometriosis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1–29, 2010.
- FRENGUELLI, B. G. The glutamatergic synapse – A key hub in neuronal metabolism, signalling and plasticity. **Neuropharmacology**, v. 207, p. 108945, 1 abr. 2022.
- GARGETT, B. E.; CHAN, R. W. S. Endometrial stem/progenitor cells and proliferative disorders of the endometrium. **Minerva Ginecologica**, v. 58, n. 6, p. 511–526, dez. 2006.
- GARGETT, C. E. Uterine stem cells: What is the evidence? **Human Reproduction Update**, v. 13, n. 1, p. 87–101, 1 jan. 2007.
- GARGETT, C. E.; MASUDA, H. Adult stem cells in the endometrium. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 11, p. 818–834, 1 nov. 2010.
- GARGETT, C. E.; SCHWAB, K. E.; DEANE, J. A. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. **Human Reproduction Update**, p. dm051, 9 nov. 2015.
- GOULIELMOS, G. N. et al. Endometriosis research in the -omics era. **Gene**, v. 741, p. 144545, maio 2020.
- GRCh38.p14 - hg38 - Genome - Assembly - NCBI**. Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000001405.40/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.40/)>. Acesso em: 10 set. 2022.
- GROSS, N.; KROPP, J.; KHATIB, H. MicroRNA Signaling in Embryo Development. **Biology**, v. 6, n. 3, p. 34, 14 set. 2017.
- GRUENWALD, P. Origin of endometriosis from the mesenchyme of the celomic walls. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 44, n. 3, p. 470–474, 1 set. 1942.
- GUAN, Q. et al. Endometriosis and Opioid Receptors: Are Opioids a Possible/Promising Treatment for Endometriosis? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1633, 13 jan. 2023.
- HA, M. et al. Interspecies Regulation of MicroRNAs and Their Targets. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1779, n. 11, p. 735–742, nov. 2008.
- HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, ago. 2014.
- HACIMOTO, S. Y. S. et al. Optimal reference miRNAs for RT-qPCR assays in endometriosis menstrual blood-derived mesenchymal stem cells. 2023.
- HALME, J. et al. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. **Obstetrics and Gynecology**, v. 64, n. 2, p. 151–154, ago. 1984.
- HARTIG, S. M. et al. The microRNA interactome in metabolic homeostasis. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 26, n. 12, p. 733–745, dez. 2015.
- HAWKINS, S. M. et al. Functional MicroRNA Involved in Endometriosis. **Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 5, p. 821–832, 1 maio 2011.
- HWANG, J.-H. et al. Identification of biomarkers for endometriosis in eutopic endometrial cells from patients with endometriosis using a proteomics approach. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, n. 1, p. 183–188, jul. 2013.
- JERMAN, L. F.; HEY-CUNNINGHAM, A. J. The Role of the Lymphatic System in Endometriosis: A Comprehensive Review of the Literature1. **Biology of Reproduction**, v. 92, n. 3, p. 64, 1–10, 1 mar. 2015.
- KAAM, K. J. A. F. VAN et al. Deoxyribonucleic acid methyltransferases and methyl-CpG-binding domain proteins in human endometrium and endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 4, p. 1421–1427, 15 mar. 2011.
- KATO, K. et al. Characterization of side-population cells in human normal endometrium. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 22, n. 5, p. 1214–1223, maio 2007.
- KITAWAKI, J. et al. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Proceedings of the 15th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology “Recent Advances in Steroid Biochemistry and Molecular Biology”. v. 83, n. 1, p. 149–155, 1 dez. 2002.
- KLEMMT, P. A. B.; STARZINSKI-POWITZ, A. Molecular and Cellular Pathogenesis of Endometriosis. **Current Women’s Health Reviews**, v. 14, n. 2, p. 106–116, jun. 2018.
- KOLANSKA, K. et al. Role of miRNAs in Normal Endometrium and in Endometrial Disorders: Comprehensive Review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 16, p. 3457, jan. 2021.
- KONNO, R. et al. Gene Expression Profiling of the Rat Endometriosis Model. **American Journal of**

- Reproductive Immunology**, v. 58, n. 4, p. 330–343, 2007.
- KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D155–D162, 8 jan. 2019.
- KRISHNAMOORTHY, K.; DECHERNEY, A. H. Genetics of Endometriosis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 60, n. 3, p. 531–538, set. 2017.
- KRUEGER, F. et al. **FelixKrueger/TrimGalore: v0.6.7 - DOI via Zenodo**. Zenodo, , 23 jul. 2021. Disponível em: <<https://zenodo.org/record/5127899>>. Acesso em: 10 set. 2022
- KUAN, K. K. W. et al. Menstruation Dysregulation and Endometriosis Development. **Frontiers in Reproductive Health**, v. 3, 2021.
- KUZNETSOV, L. et al. Diagnosis and management of endometriosis: summary of NICE guidance. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 358, p. j3935, 6 set. 2017.
- LA FERLITA, A. et al. Non-Coding RNAs in Endometrial Physiopathology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 2120, 20 jul. 2018.
- LAGANÀ, A. S. et al. The Pathogenesis of Endometriosis: Molecular and Cell Biology Insights. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5615, 10 nov. 2019.
- LANGMEAD, B. et al. **Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome**. Disponível em: <<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>>. Acesso em: 10 set. 2022.
- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 3 dez. 1993.
- LEE, Y.-R.; CHEN, M.; PANDOLFI, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 9, p. 547–562, set. 2018.
- LEVANDER, G.; NORMANN, P. The Pathogenesis of Endometriosis. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 34, n. 4, p. 366–398, 1955.
- LI, T. et al. Endometriosis alters brain electrophysiology, gene expression and increases pain sensitization, anxiety, and depression in female mice. **Biology of Reproduction**, v. 99, n. 2, p. 349–359, ago. 2018.
- LIE-A-LING, M. et al. Regulation of RUNX1 dosage is crucial for efficient blood formation from hemogenic endothelium. **Development (Cambridge, England)**, v. 145, n. 5, p. dev149419, 1 mar. 2018.
- LIU, X.; DING, J.; MENG, L. Oncogene-induced senescence: a double edged sword in cancer. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 39, n. 10, p. 1553–1558, out. 2018.
- LIU, Y. et al. The role of endometrial stem cells in the pathogenesis of endometriosis and their application to its early diagnosis†. **Biology of Reproduction**, v. 102, n. 6, p. 1153–1159, 26 maio 2020a.
- LIU, Y. et al. Biological characteristics of endometriotic mesenchymal stem cells isolated from ectopic lesions of patients with endometriosis. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 346, dez. 2020b.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LOVE, M. et al. **DESeq2: Differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution**. Bioconductor version: Release (3.15), , 2022. Disponível em: <<https://bioconductor.org/packages/DESeq2/>>. Acesso em: 10 set. 2022
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 5 dez. 2014.
- LU, L.-F.; LISTON, A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. **Immunology**, v. 127, n. 3, p. 291–298, jul. 2009.
- LUIKENHUIS, S. et al. Expression of MeCP2 in postmitotic neurons rescues Rett syndrome in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 16, p. 6033–6038, 20 abr. 2004.
- MA, X. et al. Possible relevance of tumor-related genes mutation to malignant transformation of endometriosis. **European Journal of Gynaecological Oncology**, v. 37, n. 1, p. 89–94, 2016.
- MALVEZZI, H. et al. Interleukin in endometriosis-associated infertility-pelvic pain: systematic

- review and meta-analysis. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 158, n. 1, p. 1–12, jul. 2019.
- MALVEZZI, H. et al. Higher Oxidative Stress in Endometriotic Lesions Upregulates Senescence-Associated p16ink4a and  $\beta$ -Galactosidase in Stromal Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 914, jan. 2023.
- MARTINEZ, M. et al. Transcriptional Auto-Regulation of RUNX1 P1 Promoter. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0149119, 22 fev. 2016.
- MARTINI, M. et al. Possible involvement of hMLH1, p16INK4a and PTEN in the malignant transformation of endometriosis. **International Journal of Cancer**, v. 102, n. 4, p. 398–406, 2002.
- MARUYAMA, T. A Revised Stem Cell Theory for the Pathogenesis of Endometriosis. **Journal of Personalized Medicine**, v. 12, n. 2, p. 216, 4 fev. 2022.
- MASHAYEKHI, P. et al. Endometriotic Mesenchymal Stem Cells Epigenetic Pathogenesis: Deregulation of miR-200b, miR-145, and let7b in A Functional Imbalanced Epigenetic Disease. **Cell J (Yakhteh)**, v. 21, n. 2, jul. 2019.
- MASUDA, H. et al. Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/gamma c(null) immunodeficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 6, p. 1925–1930, 6 fev. 2007.
- MASUDA, H. et al. Stem Cell-Like Properties of the Endometrial Side Population: Implication in Endometrial Regeneration. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10387, 28 abr. 2010.
- MENG, X. et al. Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. **Journal of Translational Medicine**, v. 5, n. 1, p. 57, dez. 2007.
- MOROZOVA, O.; HIRST, M.; MARRA, M. A. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 10, p. 135–151, 2009.
- NASU, K. et al. Role of repressed microRNAs in endometriosis. **Medical Molecular Morphology**, v. 55, n. 1, p. 1–7, mar. 2022.
- NIKOO, S. et al. Menstrual blood-derived stromal stem cells from women with and without endometriosis reveal different phenotypic and functional characteristics. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, n. 9, p. 905–918, set. 2014.
- NOTHNICK, W. B. MicroRNAs and Endometriosis: Distinguishing Drivers from Passengers in Disease Pathogenesis. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 35, n. 2, p. 173–180, mar. 2017.
- OHLSSON TEAGUE, E. M. C. et al. MicroRNA-Regulated Pathways Associated with Endometriosis. **Molecular Endocrinology**, v. 23, n. 2, p. 265–275, fev. 2009.
- OSMAN, A. MicroRNAs in health and disease--basic science and clinical applications. **Clinical Laboratory**, v. 58, n. 5–6, p. 393–402, 2012.
- PANTANO, L. et al. **nf-core/smrnaseq: v 2.0.0 - 2022-05-31 Aqua Zinc Chihuahua**. Zenodo, , 31 maio 2022. Disponível em: <<https://zenodo.org/record/6600196>>. Acesso em: 10 set. 2022
- PANTANO, L.; ESTIVILL, X.; MARTÍ, E. A non-biased framework for the annotation and classification of the non-miRNA small RNA transcriptome. **Bioinformatics**, v. 27, n. 22, p. 3202–3203, 15 nov. 2011.
- PENARIOL, L. B. C. et al. What Do the Transcriptome and Proteome of Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Tell Us about Endometriosis? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11515, jan. 2022.
- PING MU, P. M. et al. Expression, regulation and function of MicroRNAs in endometriosis. n. 8, p. 434–438, ago. 2016.
- POSNER, R.; LAUBENBACHER, R. Connecting the molecular function of microRNAs to cell differentiation dynamics. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 16, n. 158, p. 20190437, 25 set. 2019.
- PRAŠNIKAR, E. et al. Molecular signature of eutopic endometrium in endometriosis based on the multi-omics integrative synthesis. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 37, n. 7, p. 1593–1611, jul. 2020.
- PRIANISHNIKOV, V. A. On the concept of stem cell and a model of functional-morphological structure of the endometrium. **Contraception**, v. 18, n. 3, p. 213–223, set. 1978.
- PURVES, D. et al. Long-Term Synaptic Depression. **Neuroscience**. 2nd edition, 2001.
- QI, H. et al. Integrated analysis of mRNA and protein expression profiling in tubal endometriosis. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 159, n. 5, p. 601–614, maio 2020.
- REINHART, B. J. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in

- Caenorhabditis elegans. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901–906, 24 fev. 2000.
- REKKER, K. et al. High-throughput mRNA sequencing of stromal cells from endometriomas and endometrium. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 154, n. 1, p. 93–100, jul. 2017.
- REKKER, K. et al. Differentially-Expressed miRNAs in Ectopic Stromal Cells Contribute to Endometriosis Development: The Plausible Role of miR-139-5p and miR-375. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 3789, dez. 2018.
- ROCHA, M. G. et al. Reduction of blood nitric oxide levels is associated with clinical improvement of the chronic pelvic pain related to endometriosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, p. 363–369, abr. 2015.
- SAARE, M. et al. High-Throughput Sequencing Approach Uncovers the miRNome of Peritoneal Endometriotic Lesions and Adjacent Healthy Tissues. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112630, 11 nov. 2014.
- SAARE, M. et al. Challenges in endometriosis miRNA studies — From tissue heterogeneity to disease specific miRNAs. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 9, p. 2282–2292, set. 2017.
- SALIMINEJAD, K. et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 5, p. 5451–5465, 2019.
- SAMPSON, J. A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 14, n. 4, p. 422–469, 1927.
- SAMPSON, J. A. The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 40, n. 4, p. 549–557, 1 out. 1940.
- SANTAMARIA, X.; TAYLOR, H. MicroRNA and gynecological reproductive diseases. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 6, p. 1545–1551, 1 jun. 2014.
- SCHWAB, K. E.; GARGETT, C. E. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 22, n. 11, p. 2903–2911, nov. 2007.
- SEN, C. K.; GHATAK, S. miRNA Control of Tissue Repair and Regeneration. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 10, p. 2629–2640, out. 2015.
- SHARPE-TIMMS, K. L. Endometrial anomalies in women with endometriosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 943, p. 131–147, set. 2001.
- SOOD, R.; KAMIKUBO, Y.; LIU, P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. **Blood**, v. 129, n. 15, p. 2070–2082, 13 abr. 2017.
- SPITZER, T. L. B. et al. Perivascular human endometrial mesenchymal stem cells express pathways relevant to self-renewal, lineage specification, and functional phenotype. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 2, p. 58, fev. 2012.
- TAMARU, S. et al. Endometrial microRNAs and their aberrant expression patterns. **Medical Molecular Morphology**, v. 53, n. 3, p. 131–140, 1 set. 2020.
- TARIQ, M. A. et al. Whole-transcriptome RNAseq analysis from minute amount of total RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 18, p. e120, out. 2011.
- TAY, Y. et al. Coding-Independent Regulation of the Tumor Suppressor PTEN by Competing Endogenous mRNAs. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 344–357, 14 out. 2011.
- TAY, Y.; RINN, J.; PANDOLFI, P. P. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 344–352, 16 jan. 2014.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Application note—Amplification Efficiency of TaqMan Gene Expression Assays. White Pap. 1–8.**, 2006. Disponível em: <[https://www.google.com/url?q=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/cms\\_040377.pdf&sa=D&source=docs&ust=1672776466009714&usg=AOvVaw0D3ZGAA-hFrMFx A1B5IubS](https://www.google.com/url?q=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/cms_040377.pdf&sa=D&source=docs&ust=1672776466009714&usg=AOvVaw0D3ZGAA-hFrMFx A1B5IubS)>. Acesso em: 3 jan. 2023
- TOMARI, H. et al. Contribution of senescence in human endometrial stromal cells during proliferative phase to embryo receptivity†. **Biology of Reproduction**, v. 103, n. 1, p. 104–113, 23 jun. 2020.
- TORRES-REVERÓN, A. et al. Endometriosis Is Associated With a Shift in MU Opioid and NMDA Receptor Expression in the Brain Periaqueductal Gray. **Reproductive Sciences**, v. 23, n. 9, p.

1158–1167, set. 2016.

TSUJI, S. et al. Side population cells contribute to the genesis of human endometrium. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 4 Suppl, p. 1528–1537, out. 2008.

TSUJIMURA, K. et al. miR-199a Links MeCP2 with mTOR Signaling and Its Dysregulation Leads to Rett Syndrome Phenotypes. **Cell Reports**, v. 12, n. 11, p. 1887–1901, 22 set. 2015.

VASSILOPOULOU, L. et al. Defining the genetic profile of endometriosis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 17, n. 5, p. 3267–3281, maio 2019.

VIDOTTO, T. et al. Pan-cancer genomic analysis shows hemizygous PTEN loss tumors are associated with immune evasion and poor outcome. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 5049, 28 mar. 2023.

VINATIER, D. et al. Theories of endometriosis. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 96, n. 1, p. 21–34, maio 2001.

WANG, K. et al. An integration analysis of mRNAs and miRNAs microarray data to identify key regulators for ovarian endometriosis based on competing endogenous RNAs. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 252, p. 468–475, 1 set. 2020.

WANG, M. et al. SIRT1 upregulation promotes epithelial-mesenchymal transition by inducing senescence escape in endometriosis. **Scientific Reports**, v. 12, p. 12302, 19 jul. 2022.

WANG, X.; YU, Q. Endometriosis-related ceRNA network to identify predictive biomarkers of endometrial receptivity. **Epigenomics**, v. 11, n. 2, p. 147–167, fev. 2019.

WANG, Y.; NICHOLAS, K.; SHIH, I.-M. The Origin and Pathogenesis of Endometriosis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 15, n. 1, p. 71–95, 24 jan. 2020.

WARREN, L. A. et al. Analysis of menstrual effluent: diagnostic potential for endometriosis. **Molecular Medicine**, v. 24, n. 1, p. 1, 19 mar. 2018.

WIERTELAK, E. P. et al. Illness-induced hyperalgesia is mediated by a spinal NMDA-nitric oxide cascade. **Brain Research**, v. 664, n. 1, p. 9–16, 21 nov. 1994.

WREN, J. D.; WU, Y.; GUO, S.-W. A system-wide analysis of differentially expressed genes in ectopic and eutopic endometrium. **Human Reproduction**, v. 22, n. 8, p. 2093–2102, 1 ago. 2007.

WU, M.-H.; HSIAO, K.-Y.; TSAI, S.-J. Endometriosis and possible inflammation markers. **Gynecology and Minimally Invasive Therapy**, v. 4, n. 3, p. 61–67, 1 ago. 2015.

XIE, C.; YIN, Z.; LIU, Y. Analysis of characteristic genes and ceRNA regulation mechanism of endometriosis based on full transcriptional sequencing. **Frontiers in Genetics**, v. 13, p. 902329, 1 jan. 2022.

YANG, H. et al. Integrative Analysis Reveals Regulatory Programs in Endometriosis. **Reproductive Sciences**, v. 22, n. 9, p. 1060–1072, set. 2015.

YASUI, D. H. et al. Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19416–19421, 4 dez. 2007.

YING, S.-Y.; CHANG, D. C.; LIN, S.-L. The MicroRNA (miRNA): Overview of the RNA Genes that Modulate Gene Function. **Molecular Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 257–268, 2008.

YU, H.-C. et al. Increased Association Between Endometriosis and Endometrial Cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 25, n. 3, p. 447–452, mar. 2015.

ZHANG, H. et al. 17βE2 promotes cell proliferation in endometriosis by decreasing PTEN via NFκB-dependent pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 317, n. 1, p. 31–43, 12 abr. 2010.

ZHENG, P. et al. Central Sensitization-Related Changes in Brain Function Activity in a Rat Endometriosis-Associated Pain Model. **Journal of Pain Research**, v. 13, p. 95–107, 13 jan. 2020.

ZONDERVAN, K. T.; BECKER, C. M.; MISSMER, S. A. Endometriosis. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 13, p. 1244–1256, 26 mar. 2020.

ZUBRZYCKA, A. et al. Genetic, Epigenetic, and Steroidogenic Modulation Mechanisms in Endometriosis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 5, maio 2020.

ZUCHERATO, V. S. et al. Identification of suitable reference genes for mesenchymal stem cells from menstrual blood of women with endometriosis. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 5422, dez. 2021.



## ANEXOS

## Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética



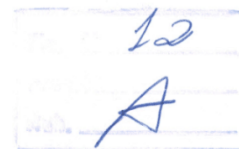
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



CÓPIA

Ribeirão Preto, 06 de fevereiro de 2013

Ofício nº 336/2013  
CEP/MGV



Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“PERFIL DIFERENCIAL DE TRANSCRITOS EM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE FLUXO MENSTRUAL DE MULHERES COM E SEM ENDOMETRIOSE E LESÕES ENDOMETRIÓTICAS”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 359ª Reunião Ordinária realizada em 04/02/2013, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Revisão 1**, de acordo com o Processo HCRP nº 15227/2012.

*De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.*

*Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.*

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

**DR<sup>a</sup>. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

**PROF. DR. RUI ALBERTO FERRIANI**  
**JULIANA MEOLA/CAMILA DE MORAES BONOCHER**  
Depto. de Ginecologia e Obstetrícia



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 24 de junho de 2019.

Ofício nº 1906/2019  
CEP/MGV

**PROCESSO HCRP nº 3644/2019**

Prezada Pesquisadora,

O trabalho intitulado “**CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ENDOMETRIAIS (eMSC) E PERSPECTIVAS NA ETIOPATOGENIA DA ENDOMETRIOSE: PERFIL DE TRANSCRITOS E IMPACTO DO FLUIDO PERITONEAL**”, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 492ª Reunião Ordinária realizada em 17/06/2019, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e para Guarda de Material Biológico Versão 2 – 04/06/2019.**

*De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.*

*Este Comitê segue integralmente a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.*

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.  
Atenciosamente.

**DRA. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA DO HCRP E DA FMRP-USP

Ilustríssima Senhora  
**JULIANA MEOLA LOVATO**  
Depto. de Ginecologia e Obstetrícia

## Anexo B - Artigo publicado relacionado à tese

International Journal of  
Molecular Sciences

Article

**Downregulation of *DROSHA*: Could It Affect miRNA Biogenesis in Endometriotic Menstrual Blood Mesenchymal Stem Cells?**Ana Clara Lagazzi Cressoni <sup>1</sup>, Leticia B. C. Penariol <sup>1</sup>, Cristiana Carolina Padovan <sup>1</sup>, Maristela D. Orellana <sup>2</sup>, Júlio Cesar Rosa-e-Silva <sup>1</sup>, Omero Benedicto Poli-Neto <sup>1</sup>, Rui Alberto Ferriani <sup>1,3</sup>, Cláudia Cristina Paro de Paz <sup>4</sup> and Juliana Meola <sup>1,3,\*</sup><sup>1</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil<sup>2</sup> Regional Blood Center, Medical School of Hemocenter Foundation of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14051-140, Brazil<sup>3</sup> National Institute of Hormones and Women's Health (Hormona)—CNPq, Porto Alegre 90035-003, Brazil<sup>4</sup> Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil

\* Correspondence: jumeola@yahoo.com.br or jumeola@usp.br; Tel.: +55-163-315-0577

**Abstract:** Menstrual blood mesenchymal stem cells (MenSCs) have gained prominence in the endometriosis scientific community, given their multifunctional roles in regenerative medicine as a noninvasive source for future clinical applications. In addition, changes in post-transcriptional regulation via miRNAs have been explored in endometriotic MenSCs with a role in modulating proliferation, angiogenesis, differentiation, stemness, self-renewal, and the mesenchymal–epithelial transition process. In this sense, homeostasis of the miRNA biosynthesis pathway is essential for several cellular processes and is related to the self-renewal and differentiation of progenitor cells. However, no studies have investigated the miRNA biogenesis pathway in endometriotic MenSCs. In this study, we profiled the expression of eight central genes for the miRNA biosynthesis pathway under experimental conditions involving a two-dimensional culture of MenSCs obtained from healthy women ( $n = 10$ ) and women with endometriosis ( $n = 10$ ) using RT-qPCR and reported a two-fold decrease in *DROSHA* expression in the disease. In addition, miR-128-3p, miR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-452-3p, miR-216a-5p, miR-216b-5p, and miR-93-5p, which have been associated with endometriosis, were identified through in silico analyses as negative regulators of *DROSHA*. Because *DROSHA* is essential for miRNA maturation, our findings may justify the identification of different profiles of miRNAs with *DROSHA*-dependent biogenesis in endometriosis.

**Keywords:** endometriosis; *DROSHA*; miRNA biosynthesis; MenSC; RT-qPCR

**Citation:** Cressoni, A.C.L.; Penariol, L.B.C.; Padovan, C.C.; Orellana, M.D.; Rosa-e-Silva, J.C.; Poli-Neto, O.B.; Ferriani, R.A.; de Paz, C.C.P.; Meola, J. Downregulation of *DROSHA*: Could It Affect miRNA Biogenesis in Endometriotic Menstrual Blood Mesenchymal Stem Cells? *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 5963. <https://doi.org/10.3390/ijms24065963>

Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24065963>