

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

LUANA GRUPIONI LOURENÇO ANTÔNIO

**Expressão diferencial de genes e microRNAs relacionados com as vias
de adesão e apoptose nos diferentes fenótipos de pacientes com
endometriose**

Ribeirão Preto

2021

LUANA GRUPIONI LOURENÇO ANTÔNIO

**Expressão diferencial de genes e microRNAs relacionados com as vias
de adesão e apoptose nos diferentes fenótipos de pacientes com
endometriose**

Tese apresentado à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar Rosa e Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Meola Novato

Ribeirão Preto

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: _____ Data: ___ / ___ / ___

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) por meio do Programa de Excelência acadêmica (PROEX).

FICHA CATALOGRÁFICA

Antônio, Luana Grupioni Lourenço

Expressão diferencial de genes e microRNAs relacionados com as vias de adesão e apoptose nos diferentes fenótipos de pacientes com endometriose. Ribeirão Preto, 2021.

61 p

Tese (doutorado) - Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar Rosa e Silva.

1. Endometriose, 2. Fisiopatogenia, 3. genes MAPK1 e CAPN2, 4. microRNAs, 5. Adesão, 6. Apoptose.

FOLHA DE APROVAÇÃO DE DOUTORADO

Nome: Luana Grupioni Lourenço Antônio

Título: Expressão diferencial de genes e microRNAs relacionados com as vias de adesão e apoptose nos diferentes fenótipos de pacientes com endometriose

Tese apresentada 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 Doutorado.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICO

Aos meus pais, Antônio e Maria de Lourdes, pelo amor incondicional e total apoio. Vocês são os meus exemplos de vida e por isso dedico todas as minhas vitórias a vocês.

Aos meus irmãos, Jéssica e Alan, pela amizade, respeito, companheirismo e amor. Vocês fazem dos meus dias mais felizes e me dão a certeza de que nunca estarei só.

Ao Rafael, meu marido, pela paciência, dedicação, companheirismo, carinho, compreensão e amor. Você que de forma especial me deu força e coragem, me apoiando em todos os momentos. Meu grande incentivador.

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço à Deus pela vida, saúde e oportunidade de aprender com todos.

Ao Prof. Dr. Júlio Cesar Rosa e Silva, orientador dessa tese, pela competência, respeito, oportunidade, confiança, ensinamentos, dedicação e compreensão. Nosso convívio foi de fundamental importância não só para elaboração desse trabalho, mas também para meu amadurecimento profissional.

À Prof^a. Dr^a. Juliana Meola Novato, co-orientadora dessa tese, pela amizade e constante contribuições em todas as etapas da elaboração desse trabalho.

À técnica de laboratório, Cristiana Padovan, por todo auxílio técnico durante os experimentos, conselhos e amizade nesses anos de doutorado e também nos anteriores, sendo essenciais do começo ao fim.

Aos técnicos Lilian, Stella e Ronaldo por toda ajuda e disponibilidade durante a parte experimental desse trabalho. À Suleimy pelo auxílio nas análises estatísticas desse trabalho. E à secretária do programa, Suelen, que sempre auxiliou nos transtornos da PPG e tranquilizando-nos.

Aos amigos de laboratório, Renata, Michele, Caroline, Fabiana, Izadora, Letícia, Valéria, Rafael, Luana, Marília, Ana, Maria Fernanda, Paulo, Danyelle e Ariane, pessoas nas quais conviveram comigo durante a realização deste trabalho e tornaram-no mais divertido e especial.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo, pela atenção e por me proporcionarem uma excelente formação.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por oferecer toda estrutura necessária para a realização desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto de pesquisa (Processo 2018/02034-3), tornando possível a produção desta tese. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento da bolsa de doutorado e taxa de bancada. E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) por meio do Programa de Excelência acadêmica (PROEX) que também apoiou a realização deste trabalho.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, Antonio e Maria de Lourdes, aos meus irmãos, Jéssica e Alan, aos meus cunhados, Stefen, Juliana, Fernanda, Thiago e Tiago, aos meus sogros, Fernando (in memoriam) e Carmen (in memoriam). Obrigada pela constante disponibilidade, apoio e amor fraterno. Vocês são meu verdadeiro significado de vida.

Ao meu marido, Rafael, por todo apoio, amor, carinho, compreensão, dedicação, inspiração, companheirismo e encorajamento.

E finalmente, agradeço a todos que contribuíram direto ou indiretamente para a minha formação e realização deste trabalho.

“Se eu vi mais longe foi por estar sobre os ombros de gigantes.”

(Isaac Newton, 1676)

RESUMO

RESUMO

Antônio, LGL. **Expressão diferencial de genes e microRNAs relacionados com as vias de adesão e apoptose nos diferentes fenótipos de pacientes com endometriose.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP, 2021.

Introdução: A endometriose é uma doença ginecológica benigna, que afeta principalmente mulheres em idade reprodutiva e está associada a dor pélvica, dismenorréia, dispareunia e infertilidade. Atualmente são reconhecidos três fenótipos diferentes principais para a endometriose: endometrioma ovariano, endometriose peritoneal superficial e endometriose infiltrante profunda. Dados clínicos sugerem uma distinção clara em termos de diagnóstico, tratamento e seguimento entre esses fenótipos. No entanto, a maioria das pesquisas patogênicas sobre a endometriose foram conduzidas misturando essas manifestações fenotípicas, de forma que até o momento se faz necessário uma melhor compreensão molecular dessas lesões, a fim de dar uma gestão eficiente e específica para cada subgrupo. Os processos de adesão e fuga de apoptose parecem essenciais para o desenvolvimento e manutenção dessa doença. Além disso, mais recentemente foi relatada a importância dos microRNAs na fisiopatologia da endometriose. **Objetivos:** A proposta desse trabalho é investigar o perfil de expressão de genes (*MAPK1* e *CAPN2*) e microRNAs (miR-30a-5p, miR-7-5p, miR-143-3p e miR-93-5p) envolvidos nas vias de adesão e apoptose em endometriose peritoneal superficial, endometriose infiltrante profunda e endometrioma ovariano e avaliar se essas lesões compartilham os mesmos mecanismos fisiopatológicos. **Pacientes e Métodos:** Foram utilizadas amostras de lesão profunda (n=10), lesão superficial (n=10) e endometrioma ovariano (n=10) de pacientes afetadas pela endometriose em tratamento no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. A coleta foi realizada durante laparoscopia e o tecido armazenado em freezer -80°C, para posterior análise da expressão gênica através da técnica de RQ-PCR. Para a extração de RNA foi utilizado *AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen)*, a síntese de cDNA foi realizada com o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)* e para RQ-PCR utilizamos sistemas disponíveis comercialmente *TaqMan Assay-on-demand (Applied Biosystems)*. **Resultados:** as expressões *MAPK1* de (p <0,0001), miR-93-5p (p = 0,0168) e miR-7-5p (p = 0,0006) foram significativamente menores na endometriose superficial em comparação com a lesão profunda e endometrioma ovariano. A expressão de miR-30a (p = 0,0018) e miR-93 (p = 0,0052) foram significativamente hiperreguladas no endométrio eutópico de mulheres com endometriose em comparação com controles. A expressão do miR-143 (p = 0,0225) também mostrou diferença estatística no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e grupo controle. Além disso, a expressão de *MAPK1* (p <0,0001) e miR-93 (p = 0,0021) foi significativamente menor na lesão em comparação com o endométrio eutópico correspondente. **Conclusão:** A endometriose superficial apresentou menor expressão gênica pró-sobrevivência e miRNAs envolvidos nessa via, indicando que esse fenótipo possui mecanismo fisiopatológico diferente em relação ao endometrioma ovariano e endometriose infiltrante profunda.

Palavras-chave: Endometriose, Fisiopatogenia, Genes, MicroRNAs, Adesão, Apoptose.

ABSTRACT

ABSTRACT

Antônio, LGL. **Differential expression of genes and microRNAs related to adhesion and apoptosis pathways in the different phenotypes of patients with endometriosis.** Medical School of Ribeirao Preto/ USP, 2021.

Introduction: Endometriosis is a benign gynecological disease, which mainly affects women in reproductive age and is associated with pelvic pain, dysmenorrhea, dyspareunia and infertility. Currently, three main phenotypes for endometriosis are recognized: ovarian endometrioma, superficial peritoneal endometriosis and deep infiltrating endometriosis. Clinical data suggest a distinction in terms of diagnosis, treatment and follow-up between these phenotypes. However, most pathogenic research on endometriosis has been conducted mixing these phenotypic manifestations, so far, a better molecular understanding of these lesions is needed to provide an efficient and specific management for each subgroup. Adhesion and evasion of apoptosis processes seem essential for the development and maintenance of this disease. More recently, the importance of microRNAs in the pathophysiology of endometriosis has been reported. **Objectives:** This work aims to investigate the expression profile of genes (*MAPK1* and *CAPN2*) and microRNAs (miR-30a-5p, miR-7-5p, miR-143-3p and miR-93-5p) involved in adhesion and apoptosis pathways in superficial peritoneal endometriosis, deep infiltrating endometriosis and ovarian endometrioma and to evaluate whether these lesions share the same pathophysiological mechanisms. **Patients and Methods:** We used samples of deep lesion (n = 10), superficial lesion (n = 10) and ovarian endometrioma (n=10) of patients affected by endometriosis under treatment at Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. The collection was performed during laparoscopy and the tissue was stored in a freezer -80°C, for further analysis of the gene expression by the RQ-PCR technique. RNA extraction was performed with *AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen)*, followed by cDNA synthesis that was performed using commercial kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)* and RQ-PCR using *TaqMan Assay-on-demand (Applied Biosystems)*. **Results:** *MAPK1* (p < 0.0001), miR-93-5p (p = 0.0168), and miR-7-5p (p = 0.0006) expressions were significantly lower in superficial peritoneal endometriosis compared to deep infiltrating endometriosis and ovarian endometrioma. The expression of miR-30a (p = 0.0018) and miR-93 (p = 0.0052) were significantly up-regulated in the eutopic endometrium of women with endometriosis compared to controls. The expression of miR-143 (p = 0.0225) also showed a statistical difference between the eutopic endometrium of women with endometriosis and the control group. In addition, the expression of *MAPK1* (p <0.0001) and miR-93 (p = 0.0021) were significantly lower in the lesion compared to the corresponding eutopic endometrium. **Conclusion:** superficial peritoneal endometriosis showed lower pro-survival gene expression and miRNAs involved in this pathway, indicating that this phenotype has a different pathophysiological mechanism than deep infiltrating endometriosis and ovarian endometrioma.

Keywords: Endometriosis. Pathophysiology. Genes. microRNAs. Adhesion. Apoptosis.

LISTAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação da média (\pm erro padrão) da expressão dos genes e miRNAs na endometriose peritoneal superficial (S), endometriose infiltrante profunda (P) e endometrioma ovariano (O).....34
- Figura 2.** Representação da média (\pm erro padrão) da expressão dos genes e miRNAs de endométrio eutópico controle (CE) e endométrio eutópico de mulheres com endometriose (EE).....35
- Figura 3:** Representação da média (\pm erro padrão) da expressão dos genes e miRNAs no endométrio eutópico de mulheres com endometriose peritoneal superficial (ES), endometriose infiltrante profunda (EP), endometrioma ovariano (EO) e endométrio eutópico do controle (CE).....36
- Figura 4:** Representação da média (\pm erro padrão) da expressão dos genes e miRNAs na lesão ectópica e no endométrio eutópico correspondente de mulheres com endometriose. Endometriose peritoneal superficial (S), endometriose infiltrante profunda (P) e endometrioma ovariano (O).....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cálculo do tamanho amostral utilizando pacote pwr do software R.....	28
Tabela 2: Dados das pacientes com Endometriose.....	32
Tabela 3: Variáveis demográficas das pacientes do estudo.....	33

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Endometriose	16
1.2 Fenótipos da endometriose	17
1.3 Fisiopatogenia da endometriose.....	18
1.4 Endometriose e vias de adesão e apoptose	19
1.5 Os microRNAs.....	20
1.6 Endometriose e microRNAs.....	21
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivos gerais	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3. PARTICIPANTES E MÉTODOS.....	26
3.1 Participantes	27
<u>3.1.1. Critérios de Inclusão e Exclusão:</u>	<u>27</u>
3.2 Cálculo do tamanho amostral:	27
3.3 Coleta e processamento do material:	28
3.3.1 Extração de RNA do tecido	28
3.3.2 Integridade e quantificação.....	29
3.3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)	29
3.3.4 RQ-PCR.....	29
3.4 Análise estatística	30
3.5 Aspectos éticos	30
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÃO.....	47
7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
8. ANEXOS.....	58

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Endometriose

A endometriose é uma doença inflamatória caracterizada pela presença e crescimento de tecido endometrial fora da cavidade uterina, chamado de endométrio ectópico (POLINESS *et al.*, 2004). Em pacientes com a doença, o tecido endometriótico é comumente encontrado na cavidade pélvica, no peritônio pélvico, ovários, septo reto-vaginal, bexiga, intestino e, mais raramente, no pericárdio, pleura, fígado, rim e cérebro (GIUDICE; KAO, 2004).

A sintomatologia da endometriose envolve dismenorréia, dispaurenia, dor pélvica não cíclica, disquezia, disúria, alterações nos hábitos intestinais e, frequentemente, infertilidade (FASSBENDER *et al.*, 2015). Esses sintomas provavelmente estão associados a uma reação inflamatória peritoneal local ocasionada pelos implantes endometriais ectópicos que sofrem sangramento cíclico (MANOLOVA; ZASHEVA; STAMENOVA, 2011). No entanto, a apresentação clínica é muito variável e nenhum desses sintomas são específicos para a endometriose, dificultando o seu diagnóstico (BERKER; SEVAL, 2015).

Estima-se que mais de 170 milhões de mulheres em todo o mundo sejam afetadas pela endometriose. Como o crescimento do tecido endometriótico depende do estrogênio, esta enfermidade é mais incidente durante a idade reprodutiva, acometendo de 5 a 10% das mulheres nessa fase (ZONDERVAN *et al.*, 2018), sendo rara antes da menarca e com tendência a diminuir após a menopausa (MORASSUTTO *et al.*, 2016).

A endometriose afeta substancialmente a qualidade de vida das mulheres e suas famílias e impõe custos à sociedade semelhantes aos de outras condições crônicas, estimados em US\$ 22 bilhões no ano de 2002 apenas nos EUA. Uma razão para esse alto custo é que existem tratamentos insuficientes para a doença (NOTHNICK; ALALI, 2016).

O diagnóstico é estabelecido de forma confiável somente através da visualização cirúrgica, mais comumente por videolaparoscopia, com posterior verificação histológica. Mas o endometrioma ovariano e formas nodulares profundas da doença podem ser detectados através da ultrassonografia transvaginal e ressonância magnética

(ZONDERVAN *et al.*, 2018). O biomarcador sérico com melhor resultado e usado com certa rotina em pacientes com endometriose é CA-125, que mostrou moderado potencial diagnóstico para endometriose moderada / grave. No entanto, ele tem baixa sensibilidade, com valores de 24 a 74% na concentração de corte de 35 U/ml, não sendo seu uso indicado na prática clínica (ROSA E SILVA; ROSA E SILVA; FERRIANI, 2007).

A endometriose é estadiada de acordo com critérios de pontuação formulados e revisados pela *American Society for Reproductive Medicine (ASRM)*, incluindo localização, extensão, profundidade e percentual das lesões, assim como a presença de endometriomas e aderências pélvicas. Há quatro estágios mundialmente aceitos: forma mínima (estágio I), leve (estágio II), moderada (estágio III) e severa (estágio IV). No entanto, não existe correlação entre a gravidade dos sintomas e o sistema de estadiamento (BIRMINGHAM, 1997).

O principal tratamento da endometriose envolve a remoção cirúrgica do tecido ectópico e tratamento hormonal (contraceptivos orais, progestágenos ou análogos do GnRH) para reduzir os sintomas de dor e inflamação; entretanto, esses tratamentos estão associados a muitos efeitos adversos indesejados, incluindo sintomas relacionados à menopausa e contracepção (ZONDERVAN *et al.*, 2018).

1.2 Fenótipos da endometriose

A endometriose tem apresentação heterogênea, variando de lesões peritoneais e serosas superficiais a cistos de endometriose nos ovários, podendo muitas vezes ser acompanhada por fibrose e aderências (ZONDERVAN *et al.*, 2018). Atualmente são reconhecidos três fenótipos diferentes principais para a endometriose: endometrioma ovariano, endometriose peritoneal superficial e endometriose infiltrante profunda (COLETTE *et al.*, 2013).

A endometriose superficial é assim classificada por apresentar lesões pequenas, entre 1mm e 3mm, com focos geralmente implantados no peritônio e raramente atingem órgãos. Endometrioma ovariano caracteriza-se pela presença de cistos no ovário preenchidos por típico líquido achocolatado. Endometriose profunda é aquela que apresenta as lesões de pelo menos 5mm de profundidade e podem se localizar no peritônio, bexiga, intestino, entre outros órgãos, essa última é a forma mais avançada da doença (FALCONE; FLYCKT, 2018).

Dados clínicos sugerem uma distinção clara em termos de diagnóstico, tratamento e seguimento entre esses três tipos de fenótipos (COLETTE *et al.*, 2013). No entanto, a maioria das pesquisas patogênicas sobre a endometriose foram conduzidas misturando essas manifestações fenotípicas, de forma que até o momento se faz necessário uma melhor compreensão molecular dessas lesões, a fim de dar uma gestão eficiente e específica para cada subgrupo (TOSTI *et al.*, 2015).

1.3 Fisiopatogenia da endometriose

Apesar da endometriose ter sintomatologia bem estudada, sua etiologia ainda não é bem esclarecida. Sabe-se hoje que se trata de uma doença complexa, tendo algumas teorias que buscam sua explicação. A primeira teoria que tenta explicar o surgimento da endometriose é a proposta por Meyer em 1919, conhecida como a teoria da metaplasia celômica, a qual sugere que o epitélio celômico se transforme por metaplasia em tecido semelhante ao endométrio. Porém, esta teoria não explica a presença de endometriose em locais onde os tecidos não sejam derivados de epitélio celômico (VINATIER *et al.*, 2001).

A segunda teoria é a proposta por Sampson, em 1927, chamada de teoria da implantação metastática, que explica a presença dos focos endometrióticos através do refluxo menstrual / menstruação retrógrada via tuba uterina para dentro da cavidade pélvica e a implantação metastática das células presentes nesse refluxo. O refluxo, em parte, explica o acúmulo de lesões nas regiões gravitacionalmente dependentes da cavidade pélvica. No entanto, o refluxo menstrual está presente em 90% das mulheres e, dessa forma, somente o refluxo tubário não basta para que a endometriose se estabeleça (VINATIER *et al.*, 2001; ZONDERVAN *et al.*, 2018).

Dessa forma, a menstruação retrógrada é considerada uma importante origem dos depósitos endometriais, mas outros fatores são necessários para promover a sobrevivência celular, proliferação, formação e manutenção das lesões de endometriose (ZONDERVAN *et al.*, 2018). Hoje em dia reconhece que também devem ocorrer alterações do microambiente peritoneal e, conseqüentemente, os seguintes processos são essenciais: escape do ataque do sistema imunológico (KRÁLÍČKOVÁ; VETVICKA, 2015; SIRISTATIDIS *et al.*, 2006); alterações nas concentrações locais de hormônios (GURATES; BULUN, 2003) e mediadores inflamatórios (NOTHNICK; ALALI, 2016); adesão celular (BELIARD *et al.*, 1997; WITZ, 2003); invasão tecidual (RODGERS *et al.*,

1994); fuga de apoptose (DMOWSKI *et al.*, 2001); angiogênese (DJOKOVIC; CALHAZ-JORGE, 2014; DONNEZ *et al.*, 1998) e proliferação das células ectópicas (DE ABREU *et al.*, 2006; ZEITOUN; BULUN, 1999). Mais recentemente foi lançada a possibilidade da endometriose se tratar de uma doença epigenética, com modificações na metilação do DNA e de histonas, além de alterações na expressão de RNAs não codificadores, entre esses último, os microRNAs (GUO, 2009).

Dessa forma, as teorias que tentam explicar a etiologia da endometriose parecem ser complementares, tendo essa uma origem multifatorial. No entanto, novos estudos direcionados à investigação da etiologia da endometriose ainda são necessários. De modo que o conhecimento da sua etiologia tornará mais fácil o caminho para a pesquisa e desenvolvimento de novas formas de tratar, controlar e talvez curar as mulheres que possuem esta doença.

1.4 Endometriose e vias de adesão e apoptose

Moléculas de adesão celular são receptores transmembrana que facilitam a interação intercelular e a interação celular com a matriz extracelular. Alterações específicas nas moléculas de adesão celular endometriais e peritoneais parecem facilitar a ligação do refluxo menstrual do endométrio em locais ectópicos, dando destaque principalmente para as *integrinas* $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ e *E-caderina* (WITZ, 2003). Neste contexto, a maioria dos estudos avaliaram a expressão das integrinas no endométrio eutópico (MAY *et al.*, 2011). A *integrina* $\alpha 6$ *despolarizada* (GUPTA *et al.*, 2016; VERNET-TOMÁS *et al.*, 2006) e *RHOC* (MEOLA *et al.*, 2013) estavam hiper-reguladas e *Integrinas* $\beta 3$ e $\alpha \nu \beta 3$, *osteopontin* e *vimentin* estavam hiporreguladas na endometriose (MAY *et al.*, 2011).

A apoptose contribui para a homeostase celular durante o ciclo menstrual, eliminando células senescentes do endométrio durante a fase secretora. Foi demonstrado que pacientes com endometriose apresentam susceptibilidade reduzida à apoptose em células endometriais liberadas durante a menstruação, facilitando dessa forma a sobrevivência e implantação ectópica (DMOWSKI *et al.*, 2001). Relacionado a essa via, algumas pesquisas encontraram aumento na expressão de *Bcl-2*, *MCL-1* e *CAPN7*. Além disso, foram relatadas redução na expressão de *CAPN5*, *caspases* (*casp-1* e *casp-3*), *p53* e *Bak* (MAY *et al.*, 2011).

1.5 Os microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) fazem parte do grupo de pequenos RNAs, não-codificantes de proteínas, que apresentam fita simples, constituídos por aproximadamente 22 nucleotídeos e que tem como alvo os RNAs mensageiros. Os miRNAs agem como importantes reguladores da expressão gênica, atuando a nível pós-transcricional, por meio da indução da degradação do mRNA ou bloqueio da síntese da proteína (HAMMOND, 2006). De acordo com o banco de dados da miRBase Versão 22 (www.mirbase.org/) mais de 38 mil miRNAs foram descobertos até o momento, sendo estimado que eles apresentam como alvo cerca de 60% dos genes de humanos (HA; KIM, 2014).

Os miRNAs exercem seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3'UTR não traduzida do mRNA alvo. Quando há complementariedade perfeita entre miRNA e seu mRNA alvo, ocorre a degradação do mRNA. Quando a complementariedade é imperfeita, a produção da proteína final é bloqueada (BARTEL, 2009). Visto que, a sequência do miRNA maduro é curta e complementariedade exata não é necessária para o silenciamento, um grande número de diferentes mRNAs pode ser regulado por uma única espécie de miRNA e ainda, os miRNAs podem agir de forma cooperativa (HAMMOND, 2006). Ainda, embora a inibição pós-transcricional dos genes seja o mais frequente, já foi observado que alguns miRNA podem promover ativação da transcrição e intensificação da tradução, inclusive em humanos, tornando essa cadeia ainda mais complexa (ZHANG *et al.*, 2014).

Os miRNAs têm sido relacionados com importantes processos celulares, como diferenciação celular, proliferação, apoptose e metabolismo celular. Dessa forma, um melhor entendimento desses miRNAs nos permitiria entender a patogênese de várias doenças (KULSHRESHTHA *et al.*, 2007).

O interesse no uso dos miRNAs como biomarcadores vem aumentando nos últimos anos. Seu papel na regulação de uma grande variedade de alvos torna estes pequenos RNAs uma ferramenta promissora no auxílio da detecção precoce de doenças, podendo ser explorada no diagnóstico, prognóstico e novos alvos terapêuticos. Outra vantagem em seu uso é que os miRNAs apresentam maior estabilidade quando comparados aos mRNAs, sendo menos susceptíveis à modificação química e degradação por RNase (DE SMAELE; FERRETTI; GULINO, 2010). Outras características

importantes dos miRNAs é a especificidade tecidual, expressão diferencial nas doenças e facilidade de detecção (WEILAND *et al.*, 2012).

No entanto, a utilização de um único miRNA como biomarcador é limitada devido à falta de especificidade e sensibilidade. Faz-se necessário uma análise da expressão alterada de um conjunto de miRNAs para a utilização destes pequenos RNAs como biomarcadores (DE SMAELE; FERRETTI; GULINO, 2010; TUMILSON *et al.*, 2014).

1.6 Endometriose e microRNAs

Os miRNAs parecem ser potentes reguladores da expressão gênica na endometriose participando de importantes eventos celulares que provocam o desenvolvimento dessa doença (OHLSSON TEAGUE *et al.*, 2009). Vários estudos mostraram que a expressão de miRNAs está alterada no endométrio eutópico (AGHAJANOVA; GIUDICE, 2011; BRAZA-BOÏLS *et al.*, 2014; BURNEY *et al.*, 2009), em tecidos ectópicos e eutópicos do endométrio (BRAZA-BOÏLS; *et al.*, 2014; OHLSSON TEAGUE *et al.*, 2009; TOLOUBEYDOKHTI; BUKULMEZ; CHEGINI, 2008) e em miRNAs circulantes em mulheres com endometriose em comparação com mulheres saudáveis (CHO *et al.*, 2015; JIA *et al.*, 2013; NOTHNICK; AL-HENDY; LUE, 2015; REKKER *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2013).

A maioria dos trabalhos com miRNA e endometriose foram realizados comparando endométrio de mulheres com e sem endometriose, encontrando em muitos casos expressão diferencial e, portanto, apresentando potencial como biomarcador desta afecção (HAWKINS *et al.*, 2011). Apesar de sua obtenção apresentar um aspecto invasivo, a vantagem no uso do tecido endometrial é que ele pode ser acessível por biópsia sem a necessidade de anestesia (FASSBENDER *et al.*, 2015). No entanto, até o momento não foi encontrado um painel com boa especificidade e sensibilidade (PANIR *et al.*, 2018).

Uma revisão realizada por Ohlsson Teague e colaboradores (2009) apontou resultados encontrados para miRNAs diferencialmente expressos em endometriose e que apresentam funções reguladoras na hipóxia, inflamação, reparo tecidual, vias reguladas por TGF β , crescimento celular, proliferação celular, apoptose, remodelação da matriz extracelular e angiogênese. Estes achados corroboram com a hipótese de que os miRNAs

são de grande importância na patogênese da endometriose (OHLSSON TEAGUE *et al.*, 2009).

Ainda, foi demonstrado 156 miRNAs diferencialmente expressos entre o tecido endometriótico e o endométrio normal, incluindo doze miRNAs conhecidos por estarem envolvidos na angiogênese (BRAZA-BOÏLS *et al.*, 2014). A comparação da expressão dos miRNAs em mulheres com endometriose leve e severa também mostrou diferenças, apresentando hiperexpressão de miR-21 e *DICER* no estágio mais avançado da doença (AGHAJANOVA; GIUDICE, 2011). Outros miRNAs e mRNAs cognatos preditos demonstraram expressão diferencial no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose, incluindo miR-23a/*CYP19A1* e miR-542-3p/*COX2* (TOLOUBEYDOKHTI *et al.*, 2008).

Segundo uma metanálise, existem miRNAs consistentemente hiper e hiporregulados nos focos ectópicos em relação ao endométrio eutópico de mulheres saudáveis. Como hiperexpresso foram encontrados: miR-202, miR-365, miR-1, miR-150; já os miRNAs hipoexpressos foram: miR-23b, miR-200b, miR-200a, miR-200c, miR-141, miR-375, miR-106b, miR-196b, miR-15b. Já outros miRNAs foram descritos de forma controversa (ora hiper, ora hiporregulados): miR-100, miR-17-5p, miR-29c, miR-20a, miR-126, miR-145, miR-125a, miR-99a, miR-143, , miR-23a, miR-222, miR-199a, miR-125b, miR-21, miR-221 (WEI; XU; KUANG, 2015).

Dessa forma, um grande número de miRNAs desregulados foi relatado. No entanto, a concordância entre o resultado entre diferentes estudos permanece pequena. Uma possível explicação é a heterogeneidade na composição tecidual, já que alguns estudos compararam biópsias de lesões completas altamente heterogêneas e alguns usaram frações celulares puras isoladas. De forma que um mesmo miRNA se mostrou hiper e hiporregulado na endometriose (SAARE *et al.*, 2017).

Ainda, além de diferentes populações celulares, uma grande crítica é a não avaliação molecular da endometriose nos diferentes fenótipos da doença. Haikalis et al (2018) avaliou separadamente a expressão nos 3 tipos de lesão. As expressões de miR-21 e miR-424 foram significativamente menores na lesão superficial em comparação com o endometrioma. Já a expressão do miR-10b na lesão profunda foi significativamente menor que no endometrioma. Não houve diferença na expressão dos seguintes miRNAs: miR-9, miR-10a e miR-204. Os autores concluíram que o padrão de expressão dos

miRNAs é dependente do tipo de lesão endometriótica estudada (HAIKALIS *et al.*, 2018).

Desvendar o significado dos miRNAs na endometriose abrirá caminho para um melhor conhecimento da fisiopatologia dessa doença e novos testes diagnósticos, além de identificar novos alvos terapêuticos e abordagens de tratamento que têm o potencial de melhorar as opções clínicas para mulheres com essa condição incapacitante. Contudo, apesar do aumento no número de pesquisa, até à data, a utilidade dos miRNAs para essa finalidade não foi testada especificamente (PANIR *et al.*, 2018).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Investigar o perfil de expressão de genes e microRNAs envolvidos nas vias de adesão e apoptose nos diferentes fenótipos da endometriose e avaliar se essas lesões compartilham ou não os mesmos mecanismos fisiopatológicos.

2.2 Objetivos específicos

Quantificar a expressão dos genes *MAPK1* e *CAPN2* e dos microRNAs miR-30a-5p, miR-7-5p, miR-143-3p e miR-93-5p na endometriose peritoneal superficial, endometriose infiltrante profunda e endometrioma ovariano por PCR em tempo real.

PARTICIPANTES E MÉTODOS

3. PARTICIPANTES E MÉTODOS

Esse trabalho trata-se de um estudo observacional do tipo corte transversal e foi desenvolvido no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), no Laboratório Multiusuário de Biologia da Reprodução.

3.1 Participantes

No presente trabalho foram utilizadas amostras de lesão profunda (n=10), lesão superficial (n=10) e endometrioma ovariano (n=10) de pacientes afetadas pela endometriose, além do grupo controle (n=10), onde foram obtidas amostras de endométrio eutópico. Para tanto, foram incluídas pacientes que preencheram os critérios de inclusão e exclusão, que consentiram em participar do estudo após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

3.1.1. Critérios de Inclusão e Exclusão:

Foram incluídas no estudo, mulheres com endometriose, diagnosticada com qualquer estágio da doença durante a videolaparoscopia diagnóstica (segundo *American Society for Reproductive Medicine*) em idade reprodutiva (entre 18 e 46 anos). Essas pacientes foram encaminhadas pelo serviço pelo Ambulatório de Dor Pélvica e Endoscopia (AGDE) e pelo Ambulatório de Infertilidade Conjugal (AEST) do HCFMRP-USP.

Foram excluídas do estudo, mulheres com idade inferior a 18 anos, menopausadas, infecção pelo vírus HIV ou qualquer infecção ativa; tabagismo, alcoolismo ou drogadição.

3.2 Cálculo do tamanho amostral:

O tamanho da amostra foi determinado a partir da adoção de uma força de 85% e um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$) em um teste bicaudal. Esta determinação foi

realizada a partir do pacote *pwr* do software estatístico R (ver Champely (2016)). Além disso, foram utilizados como parâmetros prévios para o teste um desvio padrão de 0,11 conforme apresentado por (ZHOU; FU; XIAO; YANG *et al.*, 2016) e uma diferença de média significativa de 0,15 o que, conseqüentemente, representa um tamanho de efeito (d) de 1,36 e um N de 10,76 (Tabela 1).

Tabela 1. Cálculo do tamanho amostral utilizando pacote *pwr* do software R. N é o tamanho em cada grupo.

Cálculo da força do teste (<i>t test</i>) para duas amostras	
N	10,76
D	1,36
Nível de significância	0,05
Força do teste	0,85
Hipótese alternativa	two.sided

3.3 Coleta e processamento do material:

A coleta foi realizada no período entre 2018 e 2019, durante laparoscopia no HCFMRP/USP e foram armazenadas em freezer -80°C e catalogadas. Ainda, foram utilizadas amostras do biorrepositório de endometriose aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) desta Instituição em 2006 (Processo HCRP nº9699/2006) e coletados até o ano de 2012 quando ocorreu a mudança das normativas que regem os biorrepositórios no Brasil. Para isto pedimos a vinculação deste biorrepositório aprovado em 2006 a este projeto de pesquisa. Porém as amostras utilizadas neste estudo foram coletadas após 2009.

Revisamos prontuários dessas pacientes, sendo coletados dados como: data de nascimento, idade, método anticoncepcional, paridade, hábitos, estadió, medicações em uso, outras doenças associadas e características das lesões.

3.3.1 Extração de RNA do tecido

As amostras de tecido foram extraídas com *AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen)*. Para tanto, as amostras foram pesadas para que não ultrapassassem 30 mg e posteriormente os fragmentos foram homogeneizados com a utilização do aparelho

Politron®. A partir de então, foi seguido o protocolo do fabricante e imediatamente após a extração de RNA, as amostras foram armazenadas em freezer -80°C.

3.3.2 Integridade e quantificação

Para a verificação da integridade do RNA obtido, as amostras foram analisadas no *4200 TapeStation System (Agilent Technologies)*. Para a quantificação da concentração de RNA total utilizamos o *Thermo Scientific NanoDrop 2000*.

3.3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para síntese do cDNA de miRNA utilizamos o *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems)* e para os genes utilizamos *Kit High Capacity RNA cDNA (Applied Biosystems)*. A síntese do cDNA foi realizada seguindo o protocolo do fabricante ao que tange as quantidades de reagentes e tempo na ciclagem, sendo que para o miRNA utilizamos 10ng e para o gene 100ng de RNA total. Após a síntese, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

Antes da reação de PCR em tempo real, realizamos as seguintes diluições do cDNA sintetizado com água DEPC: 1:10 para o miRNA e 1:4 para o gene.

3.3.4 RQ-PCR

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a confirmação da expressão diferencial dos genes *MAPK1* (Hs01046830_m1) e *CAPN2* (Hs00965097_m1) e dos microRNAs miR-30a-5p (479448_mir), miR-7-5p (483061_mir), miR-143-3p (477912_mir) e miR-93-5p (478210_mir). A escolha dos genes foi realizada a partir do programa *DAVID v6.7 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)* e dos miRNAs a partir do *miRwalk 2.0*.

Para a análise quantitativa da expressão, foram utilizados os sistemas disponíveis comercialmente *TaqMan Gene Expression Assay (FAM)* e *TaqMan Advanced miRNA Assay (Applied Biosystems)* para os genes e miRNA respectivamente. Para os miRNAs, utilizamos como miRNA referência: hsa-miR-361-5p (478056_mir), hsa-miR-186-5p

(477940_mir) e hsa-miR-92a-3p (477827_mir). Já para os genes, foi utilizado o B2M (Hs00187842_m1) e o ACTB (Hs01060665_g1).

As reações de amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase quantitativo em tempo real (RQ-PCR) foram realizadas em triplicata numa placa de 96 poços, utilizando o reagente *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems)*. A reação teve um volume final de 10µl. Um aparelho de detecção de PCR em tempo real 7500 *Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems)* foi utilizado juntamente com o *software 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems)* para a obtenção dos valores de CT.

As condições padrão de amplificação foram: 95°C por 20 segundos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos (anelamento e extensão simultânea). Os dados de expressão foram então exportados e analisados no *Software Cloud (Thermo Fisher Scientific)*, pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.4 Análise estatística

Para análise estatística, utilizou o teste Qui-quadrado para as variáveis qualitativas e variância *One-way* e pós teste de *Tukey* para as variáveis quantitativas. Teste de *Mann Whitney* foi realizado para comparar a expressão de gene e miRNA entre o endométrio eutópico de casos e controles, e teste t pareado entre lesão ectópica e endométrio eutópico da mesma mulher com endometriose. O *software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Prism, Inc, San Diego, CA, EUA)* foi utilizado para gerar os gráficos. Consideraremos significativo um $p < 0.05$.

3.5 Aspectos éticos

Todas as mulheres assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) e o estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HCRP (Processo HCRP Nº 12514/2017 – Anexo 2). Os princípios de confiabilidade dos dados obtidos, manutenção da autonomia das participantes, sigilo à identificação pessoal e beneficência/não-maleficência dos propósitos foram respeitados, sendo que a paciente não foi submetida a situação de risco neste aspecto.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Na Tabela 2 estão apresentadas as informações a respeito das pacientes selecionadas para esse trabalho.

Tabela 2. Dados das pacientes com Endometriose.

Endometriose Peritoneal Superficial							
Pcte	Data Cirurgia	Idade	Terapia Hormonal	Paridade	Estadio	Medicação em uso	Outras patologias
1S	14/05/09	30	Depo-Provera	G1P1C1A0	mínima	setralina, propranolol	HAS
2S	10/07/12	36	Cerazette	G3P0A3C0	moderada	atenolol, clortalina, omeprazol, clonapepan	HAS
3S	09/10/12	28	Cerazette	G0	mínima	Sertralina, clonazepan	Depressão
4S	20/10/15	24	Depo-provera	G0	leve	ciprofloxdina	-
5S	23/05/19	23	Juliet	G0	mínima	-	-
6S	19/08/10	46	Não	G4P3C2A1	mínima	Omeprazol	Obesidade
7S	10/09/10	38	Não	G0	leve	-	-
8S	18/11/10	37	Não	G1A1P0C0	mínima	Pantoprazol, amitriptilina, atenolol, fluoxetina, ginikobilobe	SOP, HAS, depressão, úlcera gástrica
9S	16/02/11	33	Não	G4P1A3C1	moderada	Metiformina	Obesidade
10S	23/09/14	37	Não	G0	severa	Losartan, HCTZ	HAS
Endometriose Infiltrante Profunda							
Pcte	Data Cirurgia	Idade	Terapia Hormonal	Paridade	Estadio	Medicação em uso	Outras patologias
P-1	26/06/12	36	Não	G5P2A3C1	severa	-	-
P-2	10/09/10	33	Não	G0	moderada	Puram T4, pantoprazol	Hipotireoidismo
P-3	22/05/12	24	Gestinol	G0	severa	Profenid, buscopam	-
P-4	27/11/15	38	Não	G3P2A1C1	severa	Glifage	DM2, nefrolitíase, massa anexial
P-5	20/03/18	40	Mirena	G0	severa	-	-
P-6	26/07/18	28	Diane	G0	severa	Amitriptilina	-
P-7	20/09/18	42	Alurene	G0	severa	Gabapentina	-
P-8	11/19/18	36	Cerazette	G1A0P1C1	severa	-	-
P-9	23/01/19	36	Desogestrel	G0	severa	-	-
P10	07/02/19	40	Zoladex	G2A0P2C1	severa	Quetiapina, citalopran, morfina	Depressão
Endometrioma Ovariano							
Pcte	Data Cirurgia	Idade	Terapia Hormonal	Paridade	Estadio	Medicação em uso	Outras patologias
O-1	22/09/09	39	Não	G0	moderada	Ac. Valpróico, carbamazepina	Epilepsia
O-2	26/03/13	32	Não	G0	severa	-	-
O-3	23/04/13	31	Não	G1P1C1A0	severa	-	-
O-4	10/11/14	42	Não	G2P2A0C0	severa	Captopril	HAS
O-5	17/04/18	35	Não	G0	mínima	Sinvastatina, labarim, duloxetina, ranitidina, meclin, selozok, quetiapina	Dislipidemia, SOP, fibromialgia, cefaleia
O-6	02/10/12	32	Level	G0	severa	Omeprazol	-
O-7	19/05/15	40	Depo-provera	G2P2A0C2	moderada	Puran, concor	Hipotireoidismo
O-8	08/09/15	36	Depo-provera	G1P1A0C1	moderada	-	Obesidade
O-9	16/02/18	37	Pietra	G1P1A0C1	moderado	-	Hipotireoidismo
O-10	04/04/19	37	Pietra	G0	severa	Puran	Hipotireoidismo

As variáveis demográficas não diferiram significativamente entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3: Variáveis demográficas das pacientes do estudo. P: endometriose infiltrativa profunda; O: endometrioma ovariano; S: endometriose peritoneal superficial e C: controle.

		P	O	S	C	P valor
Paridade	Nuligesta	6	5	5	1	0,1099
	GxPx	4	5	5	9	
Medicação	Presente	6	6	8	3	0,1566
	Ausente	4	4	2	7	
Outras doenças	Presente	3	7	7	3	0,0937
	Ausente	7	3	3	7	
Idade média		35,3	36,1	33,2	31,2	0,1870

A expressão dos genes e microRNAs entre implantes ectópicos estão ilustrados na Figura 1. As expressões de *MAPK1* ($p < 0,0001$) e miR-7-5p ($p = 0,0006$) foram significativamente menores na lesão superficial em comparação com endometriose profunda e endometrioma ovariano. A expressão do miR-93-5p mostrou-se diferente entre a lesão superficial e a profunda ($p = 0,0168$). A expressão relativa de *CAPN2*, miR-143-3p e miR-30a-5p não diferiu significativamente ($p > 0,05$) nos tipos de lesão.

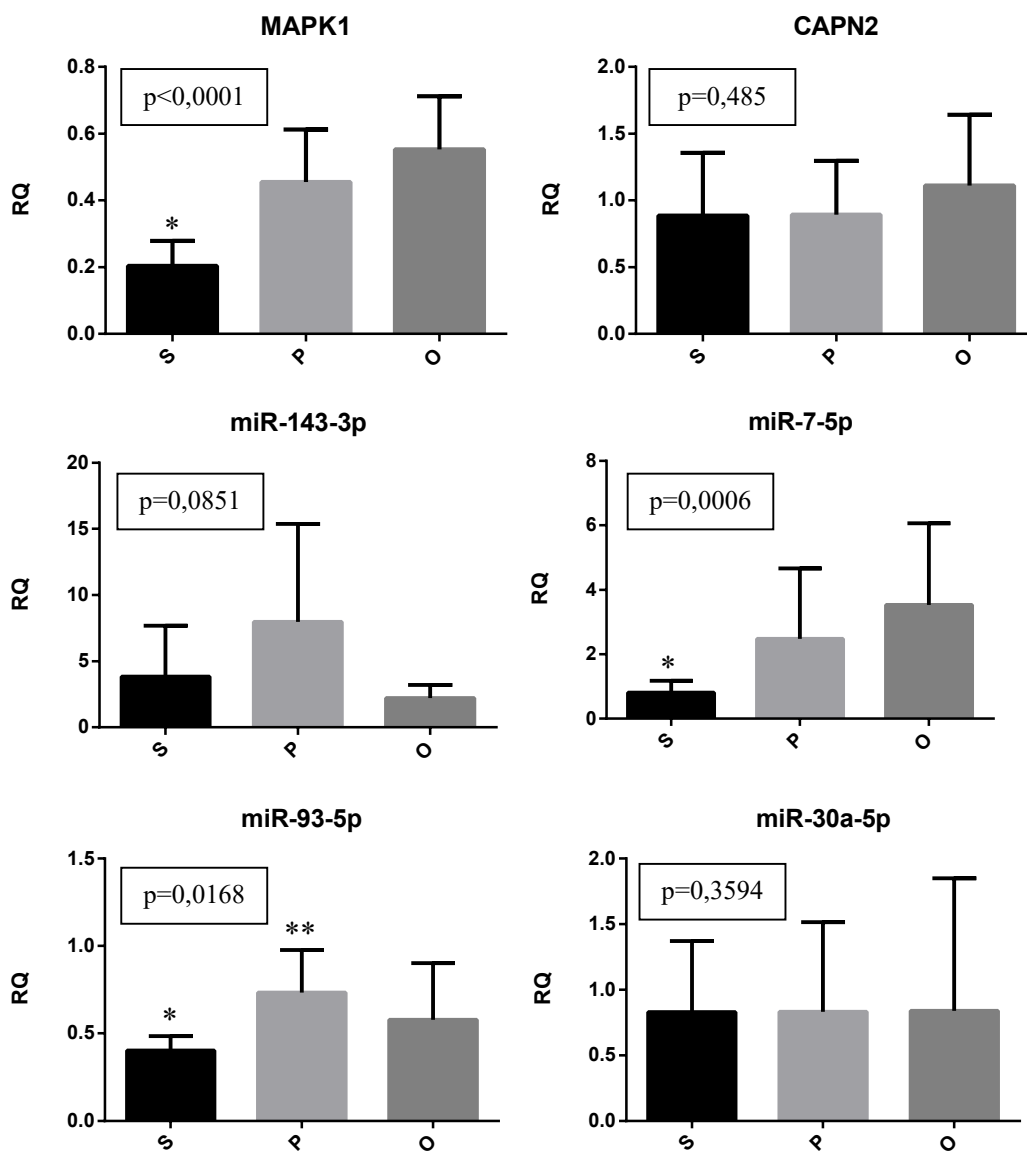


Figura 1: Representação da média (\pm erro padrão) da expressão dos genes e miRNAs na endometriose peritoneal superficial (S), endometriose infiltrante profunda (P) e endometrioma ovariano (O). Os grupos destacados com “* e **” apresentaram diferenças estatisticamente significantes no pós teste de *Tukey*.

A expressão de gene e microRNA foi comparada entre endométrio eutópico controle e endométrio eutópico de mulheres com endometriose. A expressão de miR-30a e miR-93 foram significativamente (p valor de 0,0018 e 0,0052, respectivamente) regulada positivamente no endométrio eutópico de mulheres com endometriose em comparação com controles. Já a expressão de miR-143 também apresentou diferença estatística entre os grupos (p= 0,0225), no entanto regulada negativamente nas pacientes

com endometriose. Não houve diferença na expressão de *MAPK*, *CAPN2* e miR-7 (Figura 2).

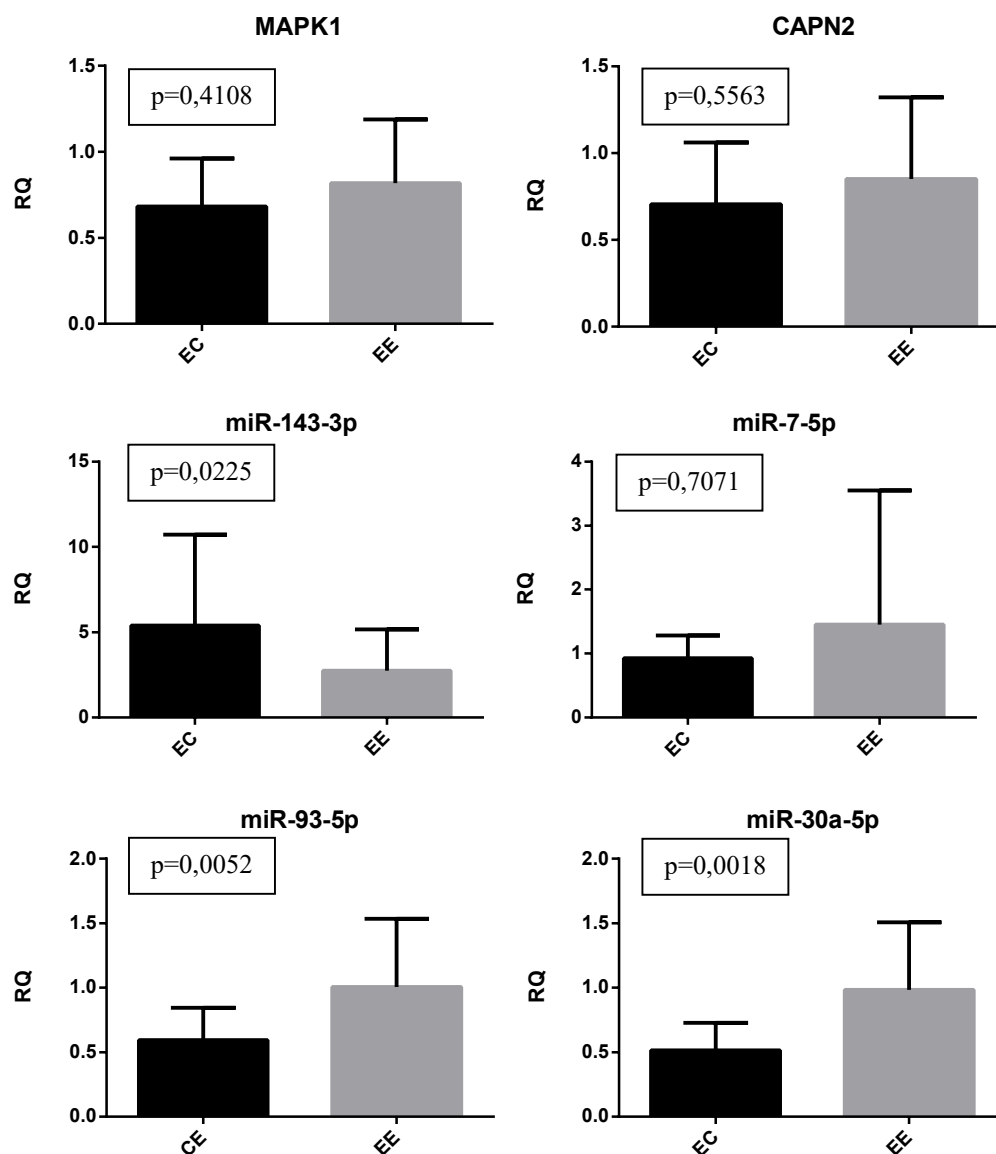


Figura 2. Representação da média (\pm erro padrão) da expressão dos genes e miRNAs de endométrio eutópico controle (CE) e endométrio eutópico de mulheres com endometriose (EE). Essa análise estatística foi realizada com Teste de *Mann Whitney*.

Comparamos a expressão dos genes e miRNAs entre o endométrio eutópico de mulheres com diferentes tipos de lesão e endométrio eutópico dos controles (Figura 3). Expressão do miR-30a foi significativamente menor no endométrio eutópico do controle comparado ao endométrio de mulheres com lesão infiltrativa profunda ($p=0,0194$) e com endometrioma ovariano ($p=0,0208$). Ainda, o endométrio eutópico do controle

demonstrou expressão reduzida de miR-93 em comparação com o endométrio eutópico de pacientes que apresentavam lesão peritoneal superficial ($p=0,0139$).

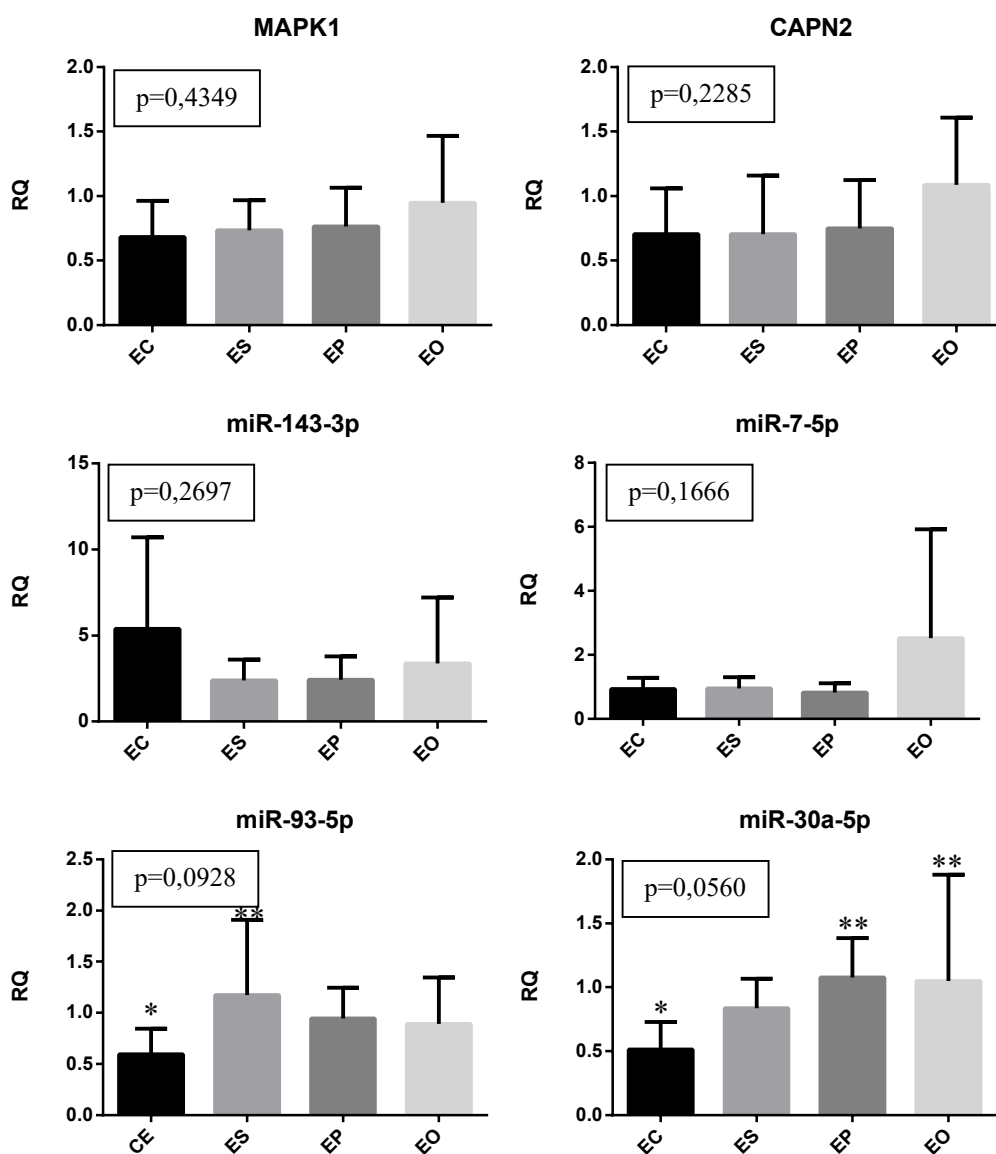


Figura 3: Representação da média (\pm erro padrão) da expressão dos genes e miRNAs no endométrio eutópico de mulheres com endometriose peritoneal superficial (ES), endometriose infiltrante profunda (EP), endometrioma ovariano (EO) e endométrio eutópico do controle (CE). Os grupos destacados com “* e **” apresentaram diferenças estatisticamente significantes no pós teste de *Tukey*.

As expressões dos genes e microRNAs em implantes ectópicos foi comparada com as expressões em endométrio eutópico correspondente (dentro da mesma mulher).

Expressão de *MAPK1* ($p < 0,0001$) e miR-93 ($p = 0,0021$) foi significativamente menor na lesão em comparação com o endométrio eutópico correspondente. Já miR-143 apresentou-se hiperexpresso no implante ectópico de lesões profundas em comparação com o endométrio eutópico correspondente (Figura 4).

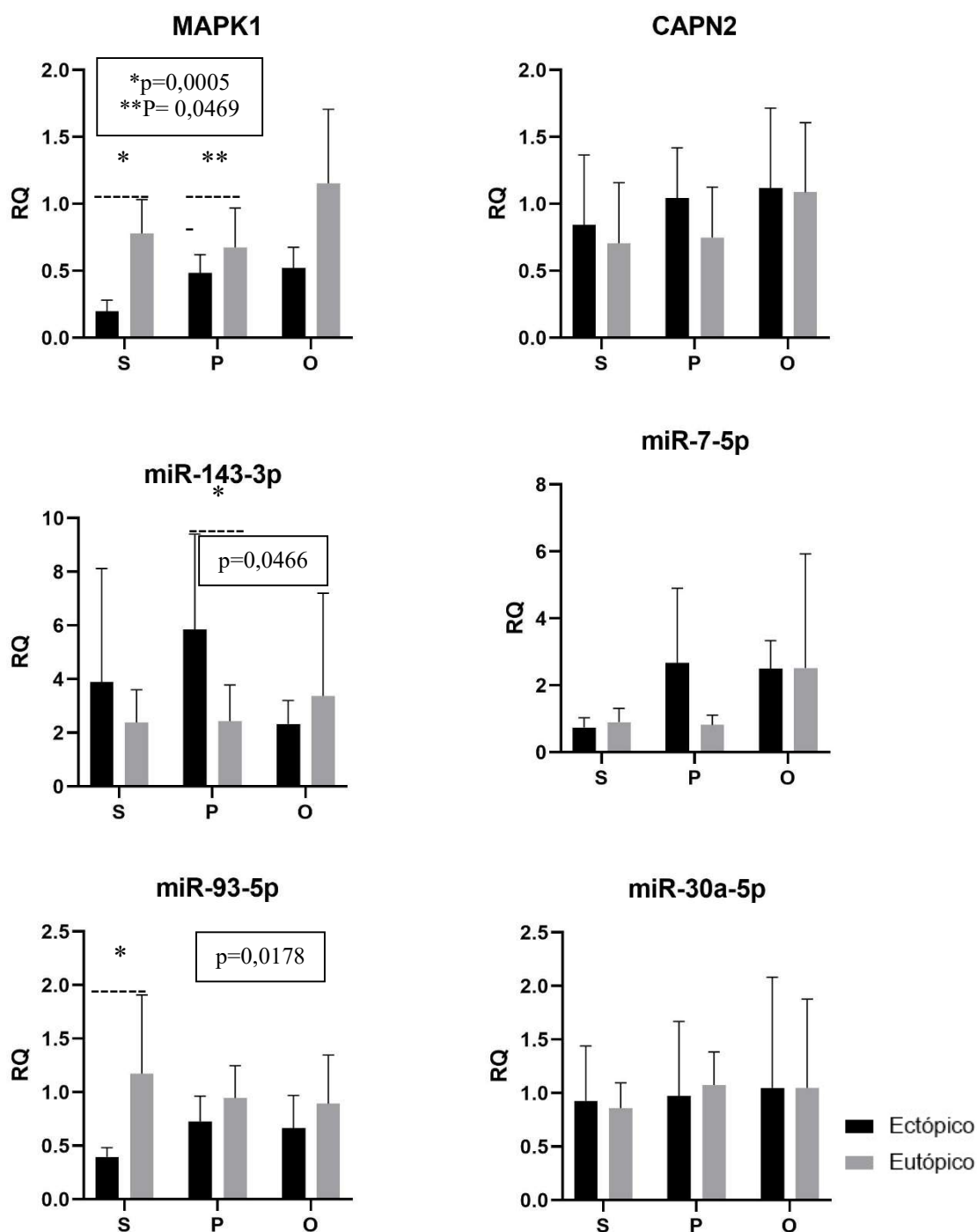


Figura 4: Representação da média (\pm erro padrão) da expressão dos genes e miRNAs na lesão ectópica e no endométrio eutópico correspondente de mulheres com

endometriose. Endometriose peritoneal superficial (S), endometriose infiltrante profunda (P) e endometrioma ovariano (O). Os grupos destacados com “* e **” apresentaram diferenças estatisticamente significantes pelo teste t pareado.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

As diversas teorias que tentam explicar a etiologia da endometriose parecem se complementar, sugerindo que a doença tenha uma origem multifatorial. No entanto, os exatos mecanismos que promovem e favorecem a sobrevivência e implantação dos focos endometrióticos em sítios ectópicos ainda não foram precisamente esclarecidos. Assim, novos estudos direcionados à investigação da etiologia da endometriose ainda são necessários. De modo que o conhecimento da sua etiologia tornará mais fácil o caminho para a pesquisa de novos testes diagnósticos, além de identificar novos alvos terapêuticos e abordagens de tratamento que têm o potencial de melhorar as opções clínicas para mulheres com essa condição incapacitante. E ainda se faz necessário a distinção desses mecanismos fisiopatológicos nos diferentes fenótipos da endometriose, de forma a contribuir para o atendimento individualizado dessas pacientes.

Os resultados do presente estudo demonstraram expressão de *MAPK1* significativamente menor na lesão superficial em comparação com endometriose profunda e endometrioma ovariano. Ainda, a expressão de *MAPK1* foi significativamente menor na lesão em comparação com o endométrio eutópico correspondente. *MAPK1* são quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), tais como hormônios sexuais, fatores de crescimento e inflamatórios, desempenhando um papel importante em muitas reações celulares ao adicionar um grupo fosfato a outras proteínas que as ativam e disparam uma cascata de reações de sinalização a jusante (ZHOU; CHEN; CHEN, 2010).

Muitos estudos mostraram esse gene participando diretamente na regulação da fisiopatologia da endometriose, de forma que a via *MAPK* estava ativada em células endometriais ectópicas e eutópicas de pacientes com endometriose (SANTULLI; *et al.*, 2015). Pesquisas que utilizaram inibidores de *MAPK1* observaram efeitos anti-inflamatório, antiproliferativo, anti-angiogênico, apoptótico e redução na adesão e migração (CHENG *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013; SANTULLI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2014; YOTOVA *et al.*, 2011).

As cascatas de sinalizações da via do *MAPK* participam dos mecanismos de sobrevivência celular, fornecendo sinais que alimentam a progressão do ciclo celular e afetam os fatores de transcrição que regulam a apoptose. Este último pode ativar *Bcl-2* ou inativar *caspase-9*, gerando assim um sinal antiapoptótico (SANTULLI *et al.*, 2015).

Zhou et al. (2010) observaram níveis aumentados de mRNA de *IL-1b*, *TNF-a*, *MMP-2* e *MMP-9* em células da cavidade peritoneal e as concentrações de proteínas *IL-1b*, *TNF-a*, *MMP-2* e *MMP-9* nos fluidos peritoneais em um modelo de camundongos com endometriose induzida. No entanto, após o tratamento com *SB203580* (inibidor de *p38 MAPK*) esse aumento foi suprimido e houve redução do peso de lesões endometrióticas. *MMP-2* e *MMP-9* estão envolvidos na degradação da matriz extracelular e exercem um papel importante na adesão celular e angiogênese. Esses achados sugerem que a inibição da atividade da *p38 MAPK* pode reduzir a inflamação relacionada à endometriose, agindo tanto nas interleucinas quanto nas metaloproteases da matriz, retardando assim a progressão da doença (ZHOU; CHEN; CHEN, 2010).

Li et al. (2013) mostraram que a capacidade da cultura de células primárias humanas do estroma endometrial eutópico de aderir ao Colágeno IV e Fibronectina é dependente de *MAPK*. Eles descobriram que o *U0126* (inibidor de *MAPK* direcionado a *MEK*) afetou a adesão e invasão das células estromais endometrióticas *in vitro* (LI et al., 2013).

A via *MAPK* que em muitas pesquisas mostrou-se estar mais ativa em tecidos endometrióticos em pacientes com endometriose desempenha um papel fundamental na indução de processos celulares, como proliferativo, antiapoptótico, inflamação, adesão/migração e respostas ao estresse (SANTULLI et al., 2015). Dessa forma, nossos resultados demonstram uma provável maior ativação dessas vias nas lesões profundas e endometrioma ovariano e que provavelmente o fenótipo de endometriose superficial possui um mecanismo fisiopatológico diferente.

Ngo et al (2010) comparou células endometriais ectópicas e eutópicas de biópsias de pacientes com endometriose e sem endometriose, observando que a via de *MAPK* é ativada em células endometriais ectópicas e eutópicas de pacientes com endometriose, conforme evidenciado por uma razão *pERK / ERK* significativamente maior nessas pacientes em comparação com o grupo controle (NGÔ et al., 2010). A proliferação e sobrevivência aumentadas de células endometriais eutópicas de pacientes com endometriose, em comparação com mulheres saudáveis, foram correlacionadas com níveis anormais de ativação da via de sinal de *MAPK* (YOSHINO et al., 2004). No entanto, em nossos resultados não obtivemos diferença na expressão de *MAPK1* no endométrio eutópico de mulheres com endometriose peritoneal superficial, endometriose infiltrante profunda, endometrioma ovariano e endométrio eutópico do controle.

MiR-93-5p e miR-143-3p regulam a expressão do gene *MAPK1*. Para ambos os miRNAs já foram realizadas pesquisas com endometriose. Os resultados do presente estudo demonstraram a regulação positiva da expressão de miR-93-5p no endométrio eutópico de mulheres com endometriose em comparação com controles, sendo essa diferença entre endométrio controle versus endométrio de mulheres com lesão peritoneal superficial. Esse resultado apoia a hipótese de que o endométrio eutópico é anormal antes da migração e implantação de tecido endometriótico ectópico.

Ainda, a expressão do miR-93 mostrou-se diferente entre a lesão superficial e a profunda, apresentando maior expressão na segunda. Outras pesquisas fizeram comparações com outros tipos de tecidos, no qual miR-93 apresentou-se hipoexpresso no endométrio ectópico de pacientes com endometriose em comparação com tecido peritoneal de pacientes sem a doença, causando aumento da expressão de *MMP-3* e *VEGFA*, estimulando a proliferação, migração e capacidade invasiva das células do estroma endometrial (LV; CHEN; LIU, 2015). O miR-93 também se demonstrou hiperexpresso em pacientes com endometriose e câncer de ovário em comparação com tecido controle (útero e ovário ressecados em doenças benignas), sendo o nível de expressão muito maior no câncer de ovário em comparação com a endometriose (BRAICU *et al.*, 2017). Esses dados não são passíveis de comparação pois os tecidos utilizados como grupo endometriose *versus* controle são diferentes.

A expressão de miR-93 foi significativamente menor em carcinomas de ovário do que em tecidos ovarianos normais. A superexpressão de miR-93-5p através de transfecção de linhagens celulares reduziu a proliferação e induziu apoptose, além de promover supressão de migração e invasão; e reduziu expressão de *RhoC*, *Bcl-xL* e *MMP-9* (CHEN *et al.*, 2015). MiR-93 também foi relatado promover apoptose em leiomioma uterino (ZHANG *et al.*, 2020). Em contrapartida, pacientes com carcinoma cervical demonstraram hiperexpressão de miR-93, *MMP-2* e *MMP-9* em comparação com tecidos de lesão benigna, estando miR-93 associado a metástases e invasão desse câncer (WANG *et al.*, 2013). A superexpressão de miR-93-5p em linhagem celular de câncer de mama humano (MDA-MB-231) diminuiu a capacidade migratória celular e o potencial invasivo, bem como aumentou a adesão. Já a inibição do miR-93 induziu efeitos opostos (SHYAMASUNDAR; LIM; BAY, 2016). Dessa forma, a ação do miR-93 ainda é muito controversa, estando em nosso estudo aparentemente mais associada com ganho da capacidade da célula em se adaptar e gerar lesões mais agressivas.

O miR-143-3p está envolvido na proliferação celular, apoptose, adesão, invasão e outros processos celulares (SHI *et al.*, 2018). A transfecção de um mimetizador de miR-143 em células de leucemia mielocítica HL-60 suprimiu notavelmente a expressão de *MAPK1*, inibindo a proliferação celular e induzindo a apoptose (SONG *et al.*, 2018). Chang *et al.* (2017) verificaram que miR-143 inibiu a proliferação, migração e invasão e promoveu a apoptose em células de câncer endometrial suprimindo *MAPK1* (CHANG *et al.*, 2017). Outros trabalhos demonstraram o papel de mir-143 como supressor tumoral, diminuindo proliferação, adesão e aumentando apoptose (ANTON *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2012).

Estudos anteriores relataram que miR-143-3p foi marcadamente desregulado na endometriose, encontrando-se hiperexpresso no soro e tecido dessas mulheres em comparação com controles (COSAR *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2021; ZHENG *et al.*, 2014).

Em nosso estudo houve regulação negativa da expressão de miR-143 no endométrio eutópico de mulheres com endometriose em comparação com endométrio controle. Ao contrário dos nossos resultados, em uma pesquisa recente, a expressão de miR-143-3p foi regulada positivamente em células estromais endometrióticas de mulheres com endometriose em comparação com tecidos endometriais eutópicos obtidos de mulheres sem endometriose. No entanto, funcionalmente, a superexpressão de miR-143-3p inibiu a proliferação e invasão de células estromais endometrióticas, de forma a inibir a progressão da endometriose (YANG *et al.*, 2021). Dessa forma, uma menor expressão do miR-143 no endométrio poderia fornecer a ele uma característica com maior potencial para proliferar e invadir, corroborando com nossos resultados.

Estudos anteriores demonstraram que miR-143 estava hiperexpresso em tecidos endometriais ectópicos em comparação com tecidos endometriais eutópicos (FILIGHEDDU *et al.*, 2010; OHLSSON TEAGUE *et al.*, 2009). Também obtivemos esse mesmo resultado no grupo com lesão profunda. De forma semelhante aos nossos achados, no carcinoma seroso de ovário houve hiperexpressão de miR-93 e hipoexpressão de miR-143 quando comparado com lesões benignas, estando correlacionados com menores sobrevida dos pacientes (WANG *et al.*, 2014).

Genes da família de *CAPN* são proteases neutras ativadas por cálcio e têm sido relatadas como reguladoras de adesão focal, remodelamento citoesquelético e apoptose. Os *CAPNs* estão paradoxalmente associados aos esforços de pró-sobrevivência ou pró-

morte (CHEN *et al.*, 2019). O gene *CAPN5* foi encontrado hipoexpresso em biopsias de endométrio eutópico de mulheres com endometriose em comparação com os controles sem a doença (PENNA *et al.*, 2008). Em contrapartida, outro trabalho encontrou a expressão de *CAPN7* aumentada no endométrio eutópico e nas células do estroma endometrial de mulheres com diagnóstico de endometriose e propuseram por testes funcionais que esse gene promove a migração e invasão de células do estroma endometrial humano por meio da regulação da *MMP-2* (LIU *et al.*, 2013). No entanto, em nosso trabalho, não encontramos diferenças entre os diferentes tipos de lesão, tão pouco entre controle e endometriose na expressão do gene *CAPN2*.

Segundo o programa *miRwalk*, miR-30a-5p e miR-7-5p são reguladores da expressão do gene *CAPN2*. A expressão de miR-7 foi significativamente menor na lesão superficial em comparação com endometriose profunda e endometrioma ovariano. O miR-7 foi relatado ser regulador da expressão de *MMP-2* e *MMP-9*, atuando na invasão e proliferação de câncer do cólon humano dirigindo a expressão da cinase de adesão focal (ZENG *et al.*, 2016). Além disso, a expressão de *MMP-2* e *MMP-9* foram relatadas aumentadas em mulheres com endometriose em comparação com controles (DI CARLO *et al.*, 2009). Dessa forma, essa via pode estar mais ativada nos fenótipos de endometriose profunda e endometrioma ovariano.

MiR-7 foi encontrado hipoexpresso em tecidos de câncer cervical em comparação com os tecidos cervicais normais adjacentes correspondentes. Além disso, a expressão de miR-7 no câncer cervical metastático foi significativamente menor em comparação com o do câncer sem metástase. A superexpressão de miR-7 por transfecção inibiu a migração e invasão de células de câncer cervical através da inibição da expressão de *FAK* (cinase de adesão focal). *FAK* é uma importante quinase de adesão que contribui para a sinalização de integrina da matriz extracelular, motilidade celular, proliferação e sobrevivência (HAO *et al.*, 2015). A superexpressão de miR-7 nas linhagens celulares de câncer cervical (HeLa e C-33A) também suprimiu a viabilidade celular e promoveu a apoptose, enquanto a inibição de miR-7 teve efeitos opostos (LIU *et al.*, 2013).

O miR-7 também se demonstrou agir como supressor tumoral em outros tumores, tais como câncer de mama (SHI *et al.*, 2015), carcinoma hepatocelular (WANG *et al.*, 2021), glioblastoma (LIU *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2017) e câncer de pulmão (LI *et al.*, 2014), induzindo apoptose, entre outras vias. Pesquisas recentes mostraram que miR-

7 tem essa ação de supressor tumoral por suprimir a via *EGFR / MAPK* (LIU *et al.*, 2014; CUI *et al.*, 2018; FAN *et al.*, 2019).

A expressão de miR-30a foi regulada positivamente no endométrio eutópico de mulheres com endometriose em comparação com controles, sendo que a diferença na expressão do miR-30a ocorreu entre controle *versus* lesão infiltrativa profunda e com endometrioma ovariano. O mir-30a regula negativamente a expressão da *integrina-β3* modulando a adesão celular e a invasão, interrompendo a via de *MAPK1* no câncer da mama triplo negativo (LI *et al.*, 2016). Corroborando com nosso resultado, alguns trabalhos observaram expressão reduzida de *integrina-β3* no endométrio de mulheres com endometriose (MAY *et al.*, 2011).

MiR-30a foi encontrado hiporregulado em uma variedade de cânceres e atua como um gene supressor tumoral. No carcinoma hepatocelular, a superexpressão de miR-30a através de transfecção bloqueou a ativação da via *K-Ras / c-Raf / MAPK*, desempenhando papel no crescimento celular e apoptose (ZHOU *et al.*, 2017). Como a endometriose utiliza vias semelhantes as tumorais para desenvolver-se, esperávamos que esse oncogene estivesse hiperexpresso na endometriose e nas lesões mais agressivas, o contrário do que encontramos.

No presente estudo, realizamos as comparações com endométrio eutópico e lesões ectópicas dentro dos casos, assumindo que a expressão diferencial dos genes e miRNAs dentro das mulheres afetadas refletiria os processos da doença em oposição às diferenças individuais na expressão e regulação dos genes. Nessa comparação, encontramos diferença na expressão do miR-93, que no grupo de mulheres com endometriose superficial, apresentou expressão regulada positivamente no endométrio eutópico em comparação com lesões ectópicas. Já a expressão de miR-143, no grupo de mulheres com endometriose profunda, apresentou expressão regulada negativamente no endométrio eutópico em comparação com lesões ectópicas.

Sabe-se que os tipos de lesões endometrióticas são bioquimicamente distintos e, portanto, a hipótese de que os miRNAs são diferencialmente expressos em endometriose peritoneal superficial, endometriose infiltrante profunda e endometrioma. Nesse contexto, uma grande crítica em trabalhos realizados nessa área é a não avaliação molecular da endometriose nos diferentes fenótipos da doença. Até o momento, poucos foram os trabalhos que realizaram essa distinção. Haikalis *et al* (2018) avaliaram separadamente a expressão nos 3 tipos de lesão. Nesta pesquisa foram utilizadas 15

amostras de endometrioma, 11 de lesão superficial e 10 de lesão profunda e avaliou-se os níveis de expressão de miR-9, miR-21, miR-424, miR-10a, miR-10b e miR-204 por qPCR. As expressões de miR-21 e miR-424 foram significativamente menores na lesão superficial em comparação com o endometrioma. Já a expressão do miR-10b na lesão profunda foi significativamente menor que no endometrioma. Não houve diferença na expressão dos seguintes miRNAs: miR-9, miR-10a e miR-204 (HAIKALIS *et al.*, 2018). De forma semelhante, em nossos resultados, o padrão de expressão dos miRNAs também foi dependente do tipo de lesão endometriótica estudada.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Nosso trabalho pode concluir que o padrão de expressão dos genes e miRNAs é dependente do tipo de lesão endometriótica estudada. Ainda, quanto aos miRNAs e genes selecionados para esse estudo, observamos que o fenótipo de lesão superficial apresentou menor expressão gênica pró-sobrevivência e miRNAs envolvidos nessa via, indicando que esse fenótipo possui mecanismo fisiopatológico diferente em relação a endometriose profunda e endometrioma ovariano.

As limitações do presente estudo incluem pequeno tamanho amostral e o predomínio de endometriose em estágio III-IV, não podendo extrapolar nossos resultados para estágios mais leves da doença. Além disso, não podemos excluir a possibilidade de que nossas amostras de tecido contenham células não endometrióticas e, assim, adicionamos outra fonte de variável aos nossos resultados. Ainda, não foi possível a obtenção de amostras de pacientes sem uso de hormônios, dado o tratamento clínico atualmente preconizado antes da cirurgia.

Os desafios para trabalhos futuros são padronizar as definições de casos e controles, a gravidade da endometriose, a fase do ciclo menstrual, amostragem dos tecidos e métodos laboratoriais. Portanto, exigem atenção rigorosa na elaboração do desenho do estudo. Essas potenciais variáveis de confusão têm sido negligenciadas e, dessa forma, dificultam as comparações entre os estudos e podem ser responsável pelos resultados controversos.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AGHAJANOVA, L.; GIUDICE, L. C. Molecular evidence for differences in endometrium in severe versus mild endometriosis. **Reprod Sci**, 18, n. 3, p. 229-251, 2011.

ANTON, L.; DEVINE, A.; SIERRA, L. J.; BROWN, A. G. *et al.* miR-143 and miR-145 disrupt the cervical epithelial barrier through dysregulation of cell adhesion, apoptosis and proliferation. **Scientific reports**, 7, n. 1, 2017.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, 136, n. 2, p. 215-233, 2009.

BELIARD, A.; DONNEZ, J.; NISOLLE, M.; FOIDART, J. M. Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. **Fertil Steril**, 67, n. 2, p. 266-272, 1997.

BERKER, B.; SEVAL, M. Problems with the diagnosis of endometriosis. **Womens Health (Lond)**, 11, n. 5, p. 597-601, 2015.

BIRMINGHAM, A. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. **Fertil Steril**, 67, n. 5, p. 817-821, 1997.

BRAICU, O. L.; BUDISAN, L.; BUIGA, R.; JURJ, A. *et al.* miRNA expression profiling in formalin-fixed paraffin-embedded endometriosis and ovarian cancer samples. **OncoTargets and therapy**, 10, 2017.

BRAZA-BOÏLS, A.; MARÍ-ALEXANDRE, J.; GILABERT, J.; SÁNCHEZ-IZQUIERDO, D. *et al.* MicroRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. **Hum Reprod**, 29, n. 5, p. 978-988, 2014.

BURNEY, R. O.; HAMILTON, A. E.; AGHAJANOVA, L.; VO, K. C. *et al.* MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. **Mol Hum Reprod**, 15, n. 10, p. 625-631, 2009.

CHAMPELY, S. (2016). Package: pwr. Retrieved from <http://cran.r-project.org/package=pwr>.

CHANG, L.; ZHANG, D.; SHI, H.; BIAN, Y. *et al.* MiR-143 inhibits endometrial cancer cell proliferation and metastasis by targeting MAPK1. **Oncotarget**, 8, n. 48, 2017.

CHEN, J.; WU, Y.; ZHANG, L.; FANG, X. *et al.* Evidence for calpains in cancer metastasis. **Journal of cellular physiology**, 234, n. 6, 2019.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023.

CHEN, X.; CHEN, S.; XIU, Y.; SUN, K. *et al.* RhoC is a major target of microRNA-93-5P in epithelial ovarian carcinoma tumorigenesis and progression. **Molecular cancer**, 14, n. 1, 2015.

CHENG, W.; CHEN, L.; YANG, S.; HAN, J. *et al.* Puerarin suppresses proliferation of endometriotic stromal cells partly via the MAPK signaling pathway induced by 17 β -estradiol-BSA. **PLoS One**, 7, n. 9, p. e45529, 2012.

CHO, S.; MUTLU, L.; GRECHUKHINA, O.; TAYLOR, H. S. Circulating microRNAs as potential biomarkers for endometriosis. **Fertil Steril**, 103, n. 5, p. 1252-1260.e1251, 2015.

COLETTE, S.; DEFRÈRE, S.; VAN KERK, O.; VAN LANGENDONCKT, A. *et al.* Differential expression of steroidogenic enzymes according to endometriosis type. **Fertil Steril**, 100, n. 6, p. 1642-1649, 2013.

COSAR, E.; MAMILLAPALLI, R.; ERSOY, G. S.; CHO, S. *et al.* Serum microRNAs as diagnostic markers of endometriosis: a comprehensive array-based analysis. **Fertility and sterility**, 106, n. 2, 2016.

CUI, X.; SUN, Y.; SHEN, M.; SONG, K. *et al.* Enhanced Chemotherapeutic Efficacy of Paclitaxel Nanoparticles Co-delivered with MicroRNA-7 by Inhibiting Paclitaxel-Induced EGFR/ERK pathway Activation for Ovarian Cancer Therapy. **ACS applied materials & interfaces**, 10, n. 9, 2018.

DE ABREU, L. G.; ROMAO, G. S.; DOS REIS, R. M.; FERRIANI, R. A. *et al.* Reduced aromatase activity in granulosa cells of women with endometriosis undergoing assisted reproduction techniques. **Gynecol Endocrinol**, 22, n. 8, p. 432-436, 2006.

DE SMAELE, E.; FERRETTI, E.; GULINO, A. MicroRNAs as biomarkers for CNS cancer and other disorders. **Brain Res**, 1338, p. 100-111, 2010.

DI CARLO, C.; BONIFACIO, M.; TOMMASELLI, G. A.; BIFULCO, G. *et al.* Metalloproteinases, vascular endothelial growth factor, and angiopoietin 1 and 2 in eutopic and ectopic endometrium. **Fertility and sterility**, 91, n. 6, 2009.

DJOKOVIC, D.; CALHAZ-JORGE, C. Angiogenesis as a therapeutic target in endometriosis. **Acta Med Port**, 27, n. 4, p. 489-497, 2014.

DMOWSKI, W. P.; DING, J.; SHEN, J.; RANA, N. *et al.* Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. **Hum Reprod**, 16, n. 9, p. 1802-1808, 2001.

DONNEZ, J.; SMOES, P.; GILLEROT, S.; CASANAS-ROUX, F. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. **Hum Reprod**, 13, n. 6, p. 1686-1690, 1998.

FALCONE, T.; FLYCKT, R. Clinical Management of Endometriosis. **Obstet Gynecol**, 131, n. 3, p. 557-571, 2018.

- FAN, X.; LIU, M.; TANG, H.; LENG, D. *et al.* MicroRNA-7 Exerts Antiangiogenic Effect on Colorectal Cancer via ERK Signaling. **The Journal of surgical research**, 240, 2019.
- FASSBENDER, A.; BURNEY, R. O.; O, D. F.; D'HOOGHE, T. *et al.* Update on Biomarkers for the Detection of Endometriosis. **Biomed Res Int**, 2015, p. 130854, 2015.
- FILIGHEDDU, N.; GREGNANIN, I.; PORPORATO, P. E.; SURICO, D. *et al.* Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. **Journal of biomedicine & biotechnology**, 2010, 2010.
- GIUDICE, L. C.; KAO, L. C. Endometriosis. **Lancet**, 364, n. 9447, p. 1789-1799, 2004.
- GUO, S. W. Epigenetics of endometriosis. **Mol Hum Reprod**, 15, n. 10, p. 587-607, 2009.
- GUPTA, D.; HULL, M. L.; FRASER, I.; MILLER, L. *et al.* Endometrial biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. **Cochrane Database Syst Rev**, 4, p. CD012165, 2016.
- GURATES, B.; BULUN, S. E. Endometriosis: the ultimate hormonal disease. **Semin Reprod Med**, 21, n. 2, p. 125-134, 2003.
- HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 15, n. 8, p. 509-524, 2014.
- HAIKALIS, M. E.; WESSELS, J. M.; LEYLAND, N. A.; AGARWAL, S. K. *et al.* MicroRNA expression pattern differs depending on endometriosis lesion type. **Biol Reprod**, 98, n. 5, p. 623-633, 2018.
- HAMMOND, S. M. MicroRNAs as oncogenes. **Curr Opin Genet Dev**, 16, n. 1, p. 4-9, 2006.
- HAO, Z.; YANG, J.; WANG, C.; LI, Y. *et al.* MicroRNA-7 inhibits metastasis and invasion through targeting focal adhesion kinase in cervical cancer. **International journal of clinical and experimental medicine**, 8, n. 1, 2015.
- HAWKINS, S. M.; CREIGHTON, C. J.; HAN, D. Y.; ZARIFF, A. *et al.* Functional microRNA involved in endometriosis. **Mol Endocrinol**, 25, n. 5, p. 821-832, 2011.
- HUANG, F.; CAO, J.; LIU, Q.; ZOU, Y. *et al.* MAPK/ERK signal pathway involved expression of COX-2 and VEGF by IL-1 β induced in human endometriosis stromal cells in vitro. **Int J Clin Exp Pathol**, 6, n. 10, p. 2129-2136, 2013.
- JIA, S. Z.; YANG, Y.; LANG, J.; SUN, P. *et al.* Plasma miR-17-5p, miR-20a and miR-22 are down-regulated in women with endometriosis. **Hum Reprod**, 28, n. 2, p. 322-330, 2013.

- KRÁLÍČKOVÁ, M.; VETVICKA, V. Immunological aspects of endometriosis: a review. **Ann Transl Med**, 3, n. 11, p. 153, 2015.
- KULSHRESHTHA, R.; FERRACIN, M.; NEGRINI, M.; CALIN, G. A. *et al.* Regulation of microRNA expression: the hypoxic component. **Cell Cycle**, 6, n. 12, p. 1426-1431, 2007.
- LI, J.; ZHENG, Y.; SUN, G.; XIONG, S. Restoration of miR-7 expression suppresses the growth of Lewis lung cancer cells by modulating epidermal growth factor receptor signaling. **Oncology reports**, 32, n. 6, 2014.
- LI, M. Q.; SHAO, J.; MENG, Y. H.; MEI, J. *et al.* NME1 suppression promotes growth, adhesion and implantation of endometrial stromal cells via Akt and MAPK/Erk1/2 signal pathways in the endometriotic milieu. **Hum Reprod**, 28, n. 10, p. 2822-2831, 2013.
- LI, W.; LIU, C.; ZHAO, C.; ZHAI, L. *et al.* Downregulation of β 3 integrin by miR-30a-5p modulates cell adhesion and invasion by interrupting Erk/Ets-1 network in triple-negative breast cancer. **Int J Oncol**, 48, n. 3, p. 1155-1164, 2016.
- LIU, H.; JIANG, Y.; JIN, X.; ZHU, L. *et al.* CAPN 7 promotes the migration and invasion of human endometrial stromal cell by regulating matrix metalloproteinase 2 activity. **Reprod Biol Endocrinol**, 11, p. 64, 2013.
- LIU, L.; YU, X.; GUO, X.; TIAN, Z. *et al.* miR-143 is downregulated in cervical cancer and promotes apoptosis and inhibits tumor formation by targeting Bcl-2. **Molecular medicine reports**, 5, n. 3, 2012.
- LIU, S.; ZHANG, P.; CHEN, Z.; LIU, M. *et al.* MicroRNA-7 downregulates XIAP expression to suppress cell growth and promote apoptosis in cervical cancer cells. **FEBS letters**, 587, n. 14, 2013.
- LIU, Z.; JIANG, Z.; HUANG, J.; HUANG, S. *et al.* miR-7 inhibits glioblastoma growth by simultaneously interfering with the PI3K/ATK and Raf/MEK/ERK pathways. **International journal of oncology**, 44, n. 5, 2014.
- LV, X.; CHEN, P.; LIU, W. Down regulation of MiR-93 contributes to endometriosis through targeting MMP3 and VEGFA. **Am J Cancer Res**, 5, n. 5, p. 1706-1717, 2015.
- MANOLOVA, N.; ZASHEVA, D.; STAMENOVA, M. **Immunobiology of endometriosis**, 38, p. 38-50, 2011.
- MAY, K. E.; VILLAR, J.; KIRTLEY, S.; KENNEDY, S. H. *et al.* Endometrial alterations in endometriosis: a systematic review of putative biomarkers. **Hum Reprod Update**, 17, n. 5, p. 637-653, 2011.
- MEOLA, J.; DENTILLO, D. B.; ROSA E SILVA, J. C.; HIDALGO, G. O. S. *et al.* RHOC: a key gene for endometriosis. **Reprod Sci**, 20, n. 8, p. 998-1002, 2013.

MORASSUTTO, C.; MONASTA, L.; RICCI, G.; BARBONE, F. *et al.* Incidence and Estimated Prevalence of Endometriosis and Adenomyosis in Northeast Italy: A Data Linkage Study. **PLoS One**, 11, n. 4, p. e0154227, 2016.

NGÔ, C.; NICCO, C.; LECONTE, M.; CHÉREAU, C. *et al.* Protein kinase inhibitors can control the progression of endometriosis in vitro and in vivo. **The Journal of pathology**, 222, n. 2, 2010.

NOTHNICK, W.; ALALI, Z. Recent advances in the understanding of endometriosis: the role of inflammatory mediators in disease pathogenesis and treatment. **F1000Res**, 5, 2016.

NOTHNICK, W. B.; AL-HENDY, A.; LUE, J. R. Circulating Micro-RNAs as Diagnostic Biomarkers for Endometriosis: Privation and Promise. **J Minim Invasive Gynecol**, 22, n. 5, p. 719-726, 2015.

OHLSSON TEAGUE, E. M.; VAN DER HOEK, K. H.; VAN DER HOEK, M. B.; PERRY, N. *et al.* MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. **Mol Endocrinol**, 23, n. 2, p. 265-275, 2009.

P, S.; L, M.; C, T.; S, C. *et al.* MAP kinases and the inflammatory signaling cascade as targets for the treatment of endometriosis? **Expert opinion on therapeutic targets**, 19, n. 11, 2015.

PANIR, K.; SCHJENKEN, J. E.; ROBERTSON, S. A.; HULL, M. L. Non-coding RNAs in endometriosis: a narrative review. **Hum Reprod Update**, 24, n. 4, p. 497-515, 2018.

PENNA, I.; DU, H.; FERRIANI, R.; TAYLOR, H. S. Calpain5 expression is decreased in endometriosis and regulated by HOXA10 in human endometrial cells. **Mol Hum Reprod**, 14, n. 10, p. 613-618, 2008.

POLINESS, A. E.; HEALEY, M. G.; BRENNECKE, S. P.; MOSES, E. K. Proteomic approaches in endometriosis research. **Proteomics**, 4, n. 7, p. 1897-1902, 2004.

REKKER, K.; SAARE, M.; ROOST, A. M.; KAART, T. *et al.* Circulating miR-200-family micro-RNAs have altered plasma levels in patients with endometriosis and vary with blood collection time. **Fertil Steril**, 104, n. 4, p. 938-946.e932, 2015.

RODGERS, W. H.; MATRISIAN, L. M.; GIUDICE, L. C.; DSUPIN, B. *et al.* Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. **J Clin Invest**, 94, n. 3, p. 946-953, 1994.

ROSA E SILVA, A. C.; ROSA E SILVA, J. C.; FERRIANI, R. A. Serum CA-125 in the diagnosis of endometriosis. **Int J Gynaecol Obstet**, 96, n. 3, p. 206-207, 2007.

SAARE, M.; REKKER, K.; LAISK-PODAR, T.; RAHMIOGLU, N. *et al.* Challenges in endometriosis miRNA studies - From tissue heterogeneity to disease specific miRNAs. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, 1863, n. 9, p. 2282-2292, 2017.

SANTULLI, P.; MARCELLIN, L.; TOSTI, C.; CHOUZENOUX, S. *et al.* MAP kinases and the inflammatory signaling cascade as targets for the treatment of endometriosis? **Expert opinion on therapeutic targets**, 19, n. 11, 2015.

SHI, H.; SHEN, H.; XU, J.; ZHAO, S. *et al.* MiR-143-3p suppresses the progression of ovarian cancer. **American journal of translational research**, 10, n. 3, 2018.

SHI, Y.; LUO, X.; LI, P.; TAN, J. *et al.* miR-7-5p suppresses cell proliferation and induces apoptosis of breast cancer cells mainly by targeting REGγ. **Cancer letters**, 358, n. 1, 2015.

SHYAMASUNDAR, S.; LIM, J.; BAY, B. miR-93 inhibits the invasive potential of triple-negative breast cancer cells in vitro via protein kinase WNK1. **International journal of oncology**, 49, n. 6, 2016.

SIRISTATIDIS, C.; NISSOTAKIS, C.; CHRELIAS, C.; IACOVIDOU, H. *et al.* Immunological factors and their role in the genesis and development of endometriosis. **J Obstet Gynaecol Res**, 32, n. 2, p. 162-170, 2006.

SONG, B.; TANG, Y. J.; ZHANG, W. G.; WAN, C. C. *et al.* MiR-143 regulates proliferation and apoptosis of myelocytic leukemia cell HL-60 via modulating ERK1. **European review for medical and pharmacological sciences**, 22, n. 11, 2018.

TOLOUBEYDOKHTI, T.; BUKULMEZ, O.; CHEGINI, N. Potential regulatory functions of microRNAs in the ovary. **Semin Reprod Med**, 26, n. 6, p. 469-478, 2008.

TOLOUBEYDOKHTI, T.; PAN, Q.; LUO, X.; BUKULMEZ, O. *et al.* The expression and ovarian steroid regulation of endometrial micro-RNAs. **Reprod Sci**, 15, n. 10, p. 993-1001, 2008.

TOSTI, C.; PINZAUTI, S.; SANTULLI, P.; CHAPRON, C. *et al.* Pathogenetic Mechanisms of Deep Infiltrating Endometriosis. **Reprod Sci**, 22, n. 9, p. 1053-1059, 2015.

TUMILSON, C. A.; LEA, R. W.; ALDER, J. E.; SHAW, L. Circulating microRNA biomarkers for glioma and predicting response to therapy. **Mol Neurobiol**, 50, n. 2, p. 545-558, 2014.

VERNET-TOMÁS, M. E. M.; PÉREZ-ARES, C. T.; VERDÚ, N.; FERNÁNDEZ-FIGUERAS, M. T. *et al.* The depolarized expression of the alpha-6 integrin subunit in the endometria of women with endometriosis. **J Soc Gynecol Investig**, 13, n. 4, p. 292-296, 2006.

VINATIER, D.; ORAZI, G.; COSSON, M.; DUFOUR, P. Theories of endometriosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 96, n. 1, p. 21-34, 2001.

WANG, C.; JIN, A.; HUANG, W.; TSANG, L. L. *et al.* Up-regulation of Bcl-2 by CD147 Through ERK Activation Results in Abnormal Cell Survival in Human Endometriosis. **J Clin Endocrinol Metab**, 100, n. 7, p. E955-963, 2015.

WANG, L.; WANG, B.; FANG, M.; GUO, F. *et al.* Identification of microRNAs and target genes involved in serous ovarian carcinoma and their influence on survival. **European journal of gynaecological oncology**, 35, n. 6, 2014.

WANG, L.; WANG, Q.; LI, H.; HAN, L. Expression of MiR200a, miR93, metastasis-related gene RECK and MMP2/MMP9 in human cervical carcinoma--relationship with prognosis. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, 14, n. 3, 2013.

WANG, W. T.; ZHAO, Y. N.; HAN, B. W.; HONG, S. J. *et al.* Circulating microRNAs identified in a genome-wide serum microRNA expression analysis as noninvasive biomarkers for endometriosis. **J Clin Endocrinol Metab**, 98, n. 1, p. 281-289, 2013.

WANG, Y.; YANG, H.; ZHANG, G.; LUO, C. *et al.* hsa-miR-7-5p suppresses proliferation, migration and promotes apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by inhibiting SPC24 expression. **Biochemical and biophysical research communications**, 561, 2021.

WEI, S.; XU, H.; KUANG, Y. Systematic enrichment analysis of microRNA expression profiling studies in endometriosis. **Iran J Basic Med Sci**, 18, n. 5, p. 423-429, 2015.

WEILAND, M.; GAO, X. H.; ZHOU, L.; MI, Q. S. Small RNAs have a large impact: circulating microRNAs as biomarkers for human diseases. **RNA Biol**, 9, n. 6, p. 850-859, 2012.

WITZ, C. A. Cell adhesion molecules and endometriosis. **Semin Reprod Med**, 21, n. 2, p. 173-182, 2003.

WU, R.; ZHOU, W.; CHEN, S.; SHI, Y. *et al.* Lipoxin A4 suppresses the development of endometriosis in an ALX receptor-dependent manner via the p38 MAPK pathway. **Br J Pharmacol**, 171, n. 21, p. 4927-4940, 2014.

YANG, H.; HU, T.; HU, P.; QI, C. *et al.* miR-143-3p inhibits endometriotic stromal cell proliferation and invasion by inactivating autophagy in endometriosis. **Molecular medicine reports**, 23, n. 5, 2021.

YOSHINO, O.; OSUGA, Y.; HIROTA, Y.; KOGA, K. *et al.* Possible pathophysiological roles of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in endometriosis. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, 52, n. 5, 2004.

YOTOVA, I. Y.; QUAN, P.; LEDITZNIG, N.; BEER, U. *et al.* Abnormal activation of Ras/Raf/MAPK and RhoA/ROCKII signalling pathways in eutopic endometrial stromal cells of patients with endometriosis. **Hum Reprod**, 26, n. 4, p. 885-897, 2011.

ZEITOUN, K. M.; BULUN, S. E. Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target. **Fertil Steril**, 72, n. 6, p. 961-969, 1999.

ZENG, C. Y.; ZHAN, Y. S.; HUANG, J.; CHEN, Y. X. MicroRNA-7 suppresses human colon cancer invasion and proliferation by targeting the expression of focal adhesion kinase. **Mol Med Rep**, 13, n. 2, p. 1297-1303, 2016.

ZHANG, D.; LIU, E.; TIAN, W.; ZHANG, Z. *et al.* MiR-93 blocks cell cycle progression and promotes apoptosis in uterine leiomyoma cells by targeting CCND1. **Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)**, 303, n. 9, 2020.

ZHANG, X.; ZHANG, X.; HU, S.; ZHENG, M. *et al.* Identification of miRNA-7 by genome-wide analysis as a critical sensitizer for TRAIL-induced apoptosis in glioblastoma cells. **Nucleic acids research**, 45, n. 10, 2017.

ZHANG, Y.; FAN, M.; ZHANG, X.; HUANG, F. *et al.* Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. **RNA**, 20, n. 12, p. 1878-1889, 2014.

ZHENG, B.; XUE, X.; ZHAO, Y.; CHEN, J. *et al.* The differential expression of microRNA-143,145 in endometriosis. **Iran J Reprod Med**, 12, n. 8, p. 555-560, 2014.

ZHOU, K.; LUO, X.; WANG, Y.; CAO, D. *et al.* MicroRNA-30a suppresses tumor progression by blocking Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway in hepatocellular carcinoma. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, 93, 2017.

ZHOU, M.; FU, J.; XIAO, L.; YANG, S. *et al.* miR-196a overexpression activates the MEK/ERK signal and represses the progesterone receptor and decidualization in eutopic endometrium from women with endometriosis. **Hum Reprod**, 31, n. 11, p. 2598-2608, 2016.

ZHOU, W. D.; CHEN, Q. H.; CHEN, Q. X. [The action of p38 MAP kinase and its inhibitors on endometriosis]. **Yao Xue Xue Bao**, 45, n. 5, p. 548-554, 2010.

ZONDERVAN, K. T.; BECKER, C. M.; KOGA, K.; MISSMER, S. A. *et al.* Endometriosis. **Nat Rev Dis Primers**, 4, n. 1, p. 9, 2018.

8. ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Título da pesquisa: "Expressão diferencial de genes e microRNAs relacionados com as vias de adesão e apoptose em lesões profundas e superficiais de pacientes com endometriose".

Pesquisadores responsáveis: Prof Dr. Julio César Rosa e Silva (tel: (16) 3602-2488)

Luana Grupioni Lourenço Antônio (tel: (16)992015281)

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso o(a) senhor(a) não aceite participar da pesquisa, não será penalizado(a) de forma alguma e seu atendimento não será prejudicado na Instituição.

O objetivo da pesquisa é entender a etiopatogenia da endometriose, de forma a colaborar para que futuramente novas formas de tratamento possam beneficiar as pacientes com esta doença.

Caso concorde em participar, o (a) senhor(a) deverá permitir a coleta de biópsia que ocorrerá no ato da laparoscopia para tratamento da endometriose e, com sua permissão, haverá a guarda do material biológico que sobrar desse procedimento realizado em nosso hospital (HC-FMRP).

Os riscos ou desconfortos da pesquisa são alguns incômodos como dor e sensação desagradável na região após acordar da anestesia. Em geral, esses sintomas são bem tolerados e passam rapidamente.

Ainda, é importante esclarecer que o consentimento para uso de materiais biológicos em pesquisas não resulta em privilégios ou benefícios econômicos para a senhora e que, infelizmente, não podemos garantir que essas informações lhe trarão benefício direto e imediato.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária e o(a) senhor(a) tem liberdade de deixar de participar a qualquer momento, é só avisar algum dos pesquisadores. Caso não aceite participar o seu tratamento no Hospital será o mesmo.

Será mantido sigilo absoluto dos dados obtidos individualmente neste estudo, para assegurar a privacidade dos participantes. Caso o(a) senhor(a) se sinta prejudicado em participar desta pesquisa, o(a) senhor(a) poderá buscar indenização de acordo com as normas vigentes no país.

Os pesquisadores estarão disponíveis para qualquer dúvida a qualquer momento durante o estudo e o sr.(a) tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa.

Caso tenha dúvidas sobre aspectos éticos desta pesquisa o(a) senhor(a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo telefone (16) 3602-2228.

Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório de Endometriose criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto ou na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com o objetivo de guardar amostras de tecido e sangue de pacientes com endometriose a fim de enriquecer o conhecimento da etiopatologia dessa doença, sendo de grande importância para propor novos alvos terapêuticos. Gostaríamos de convidá-lo (a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano de tecido e sangue de pacientes com endometriose para fins de pesquisa e análise científica.

Este material será coletado durante a laparoscopia para tratamento da endometriose em nitrogênio líquido. Após coletado será guardado em biorrepositório em freezer -80°C alocado no laboratório de Biologia da Reprodução desta instituição (Tel (16)33100577; Avenida Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre, Ribeirão Preto - SP, 14049-900), onde as amostras serão armazenadas por alguns meses. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de sangue e tecido serão identificadas por meio de códigos alfanuméricos.

Quanto ao sangue, será coletado 5mL de sangue através da introdução de uma agulha fina em uma veia do seu braço. Essa quantidade corresponde a cerca de uma colher de sopa de água, e não tem potencial para causar prejuízos a um indivíduo adulto. Em decorrência da coleta pode haver pequeno sangramento no local, de forma a gerar uma pequena região roxa que, na maioria das vezes, desaparece em três a quatro dias.

Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for

prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento.

Solicitamos também os dados de contato do(a) senhor(a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado quando não for possível realizar os exames propostos com ele por algum problema técnico.

Declaramos para os devidos fins que a cada a nova pesquisa o Sr.(a) será contatado para a utilização do seu material biológico armazenado neste biorrepositório, e também a nova pesquisa será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao senhor (a).

Dados do participante:

Nome: _____, RG: _____,
Endereço: _____, nº _____,
Bairro _____, cidade _____, telefone _____

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ **data:** _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ **data:** _____

Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____ data: _____



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



OFÍCIO Nº 3468/2017
CEP/MGV

RIBEIRÃO PRETO, 17 DE NOVEMBRO DE 2017

PREZADOS SENHORES,

O TRABALHO INTITULADO “**EXPRESSION DIFERENCIAL DE GENES E MICRORNAs RELACIONADOS COM AS VIAS DE ADESÃO E APOPTOSE EM LESÕES PROFUNDAS E SUPERFICIAIS DE PACIENTES COM ENDOMETRIOSE**”, FOI ANALISADO “AD REFERENDUM” PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E ENQUADRADO NA CATEGORIA: **APROVADO**, BEM COMO O **BIORREPOSITÓRIO** E O **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, DE ACORDO COM O PROCESSO HCRP Nº 12514/2017.

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 466/12 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

ILUSTRÍSSIMOS SENHORES

LUANA GRUPIONI LOURENÇO ANTONIO
PROF.DR.JÚLIO CESAR ROSA E SILVA(ORIENTADOR)
DEPTO. DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440
(16) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br