
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA
LINHA DE PESQUISA BIOLOGIA MOLECULAR, IMUNOLOGIA E
CÉLULAS TRONCO

RAFAELLA GEHM PETRACCO

DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DO miRNA 135 NA FASE
SECRETORA DO CICLO MENSTRUAL EM PACIENTES COM
ENDOMETRIOSE

Prof^a. Dr^a. Denise Cantarelli Machado
Orientadora

Porto Alegre
2014

RAFAELLA GEHM PETRACCO

DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DO miRNA 135 NA FASE
SECRETORA DO CICLO MENSTRUAL EM PACIENTES COM
ENDOMETRIOSE

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em Medicina e Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Denise Cantarelli Machado

Porto Alegre
2014

FICHA CATALOGRAFICA

P493ePetracco, Rafaella Gehm

Expressão do microRNA 135 em lesões de endometriose de pacientes submetidas a tratamento cirúrgico / Rafaella Gehm Petracco. -Porto Alegre: PUCRS, 2014.

095 f.: il.: tab. Inclui artigo científico.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração em Clínica Médica. Linha de Pesquisa Biologia Molecular, Imunologia e Células Tronco.

1. ENDOMETRIOSE. 2. miRNA 135. 3. HOXA10. 4. IMPLANTAÇÃO. 5. ESTUDO TRANSVERSAL EXPERIMENTAL. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Título.

CDD 618.142

CDU 618.1:577.2(043.2)

NLM WP 390

Isabel Merlo Crespo
Bibliotecária CRB 10/1201

RAFAELLA GEHM PETRACCO

DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DO miRNA 135 NA FASE
SECRETORA DO CICLO MENSTRUAL EM PACIENTES COM
ENDOMETRIOSE

Aprovada em _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani (USP)

Prof. Dr. Gustavo Py Gomes da Silveira (ISCMPA)

Profª Drª Raquel Papandreu Dibi (UFCSPA)

Profª. Drª. Bartira Ercilia Pinheiro da Costa (PUCRS)

Profª. Drª. Denise Cantarelli Machado (Orientador)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Denise Machado por aceitar entrar comigo nesta jornada de microRNAs e por tornar tudo mais fácil.

À Tina por ter sido incansável na realização dos experimentos, pela disponibilidade e pelo estímulo quando tudo parecia não dar certo.

Ao Fagner pela ajuda na parte laboratorial e pelos pensamentos positivos.

Ao Dr João Michelin pela imensa ajuda na coleta das amostras, pelos ensinamentos e pelo exemplo na medicina.

A Dra Raquel Dibi pela ajuda na coleta das amostras e pelo estímulo para seguir adiante.

Aos Doutores Ana Paula Dresch, Andrey Boeno, Ernesto Guedes, Lucas Teixeira e Paulo Sityá pela ajuda na coleta das amostras.

Aos bolsistas Bruno Linhares e Carolina Partichelli pela ajuda na realização dos experimentos.

A Dra Mariangela Badalotti pelo exemplo como pessoa e profissional e por todos os conselhos.

Ao meu pai Alvaro, por ser quem ele é.

A minha mãe Mirtez, por ser sempre meu porto seguro.

Ao meu marido Rodrigo, por tudo.

"If everyone is thinking alike then no one is thinking"
Benjamin Franklin

RESUMO

Endometriose é uma doença estrogênio dependente que, entre seus sintomas mais comuns, estão dor pélvica e infertilidade. Afeta até 15% das pacientes em idade reprodutiva e até 50% das pacientes inférteis. A etiopatogenia ainda não é bem clara, mas há evidências do envolvimento de componentes genéticos. O microRNA 135a e 135b (miR135) silencia a expressão gênica e o aumento na expressão do miR135 diminui a expressão do HOXA 10, um importante mediador da receptividade endometrial e implantação. MicroRNAs têm sua expressão alterada no endométrio de mulheres com endometriose quando comparado com o endométrio de mulheres sem a doença. Considerando que vários genes são conhecidos por terem sua expressão alterada no endométrio tópico quando comparado ao endométrio ectópico das pacientes com endometriose, foi analisado a expressão do miR135 neste dois tecidos endometriais na mesma paciente em diferentes fases do ciclo menstrual.

Após aprovação pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS e da Santa Casa de Porto Alegre, foram realizadas biopsias endometriais e exérese de lesões de endometriose de trinta e uma pacientes submetidas à cirurgia no período de março de 2013 a maio 2014 para diagnóstico ou tratamento de endometriose. Oito pacientes foram excluídas devido a níveis de mRNA muito baixos. As amostras foram divididas de acordo com o ciclo menstrual, fase proliferativa, dia 1 a 14 (n=11) e fase secretora, dia 15 a 28 (n=12). Para a detecção de miRNA foi utilizado o método poly (A) RT-PCR utilizando o kit Invitrogen NCode miRNA first-strand cDNA synthesis MIRC-50 kit (Invitrogen, California, USA). A transcrição gênica foi amplificada por PCR em tempo real, utilizando o aparelho AB 7500 (Applied Biosystems, Califórnia, USA). Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos para o miR135a e 135b e oligonucleotídeo iniciador universal. Para determinar a expressão relativa, foi utilizado o gene U6. Níveis relativos de mRNA foram apresentados utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Mann Whitney, considerando como significativo um $p < 0,05$.

Vinte e três pacientes tiveram suas amostras analisadas. Todas as amostras expressavam níveis de miR135a e miR135b. Comparando o endométrio ectópico com o endométrio tópico não houve diferença na expressão do microRNA. Quando as pacientes foram divididas nas diferentes fases do ciclo menstrual, observou-se

que durante a fase secretora, a expressão do miR135a e miR135b foi menor do que na fase proliferativa.

Em conclusão, microRNAs estão envolvidos na receptividade endometrial e há evidência da relação entre o miR135a e miR135b com HOXA10, um gene sabidamente diminuído na endometriose e relacionado à implantação embrionária. Neste trabalho, foi demonstrado uma expressão semelhante do miR135 no endométrio ectópico em comparação com o endométrio tópico e uma diminuição nesta expressão quando comparado a fase secretora com a proliferativa, provavelmente devido a baixos níveis de estrogênio e altos níveis de progesterona presentes nesta fase.

Palavras chave: Endometriose; microRNA; miR135a; miR135b; HOXA10; Implantação; Infertilidade.

ABSTRACT

Endometriosis is a well known estrogen dependent disease and its most common symptoms are severe pelvic pain and infertility. It affects up to 15% of patients on reproductive age and up to 50% of infertile patients. Its pathogenesis still unclear and there is evidence for a role of genetic components. The microRNA135a and 135b (miR135) silence gene expression and increased miR135 down-regulated HOXA 10, a key mediator of endometrial receptivity and implantation. MiRNA are aberrantly regulated in the endometrium of women with endometriosis when compared to the endometrium of disease free women. Considering that several genes are known to be differentially expressed in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis, we analyzed the expression of miR135 in the ectopic endometrium, compared with the expression in the eutopic from the same patients, and also evaluate if there is different levels of expression during the menstrual cycle. We evaluated thirty one subjects who underwent surgery from March 2013 through May 2014 for diagnosis or treatment of endometriosis, they had endometrium and endometriosis lesions biopsies taken. Approval was obtained from the PUCRS and Santa Casa Hospital Investigations Committee. Eight subjects were excluded due to low levels of mRNA. The samples were divided according to the menstrual cycle as follows: proliferative, day 1-14 (n=11) and secretory, day 15-28 (n=12). For miRNA detection, we used the poly (A) RT-PCR method using Invitrogen NCode miRNA first-strand cDNA synthesis MIRC-50 kit (Invitrogen, California, USA). Gene transcripts were amplified by real-time PCR using the AB 7500 (Applied Biosystems, California, USA) with the forward specific primers to miR135a and miR135b and the universal reverse primer complementary to the anchor primer. U6 small nuclear RNA was used as a control to determine relative miRNA expression.

Relative mRNA level was presented using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Statistical analysis was performed using unpaired Mann Whitney test for the ectopic vs. eutopic endometrium samples and for comparison between different phases of the menstrual cycle. All the analyses considered a $p < 0.05$ as significant.

Twenty three patients submitted to laparoscopic surgery for diagnosis or treatment of endometriosis had endometrium biopsy taken and excision of endometriosis lesions. All endometriosis lesions samples expressed miR135a and miR135b. Comparing with the eutopic endometrium, there weren't difference on its expression.

When the subjects were divided by the menstrual cycle phase, during the secretory phase the expression of mir135a and 135b was lower in the ectopic endometrium comparing to the proliferative phase.

MicroRNA is involved in endometrial receptivity, and there is evidence of a relation between miR135a and miR135b with HOXA10, a well know gene that is down regulated in women with endometriosis and has a strong influence on embryo implantation. Here we showed similar expression levels of miR135a and miR135b in the ectopic endometrium when compared with eutopic endometrium. However, we detected a lower expression of miR135 during the secretory phase that is likely due to physiological lower levels of estrogen and higher levels of progesterone during this phase.

Key Words: Endometriosis; microRNA; miR135a; miR135b; HOXA10; Implantation; Infertility

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
CA 125	<i>Cancer Antigen 125</i>
COX 2	Ciclooxigenase 2
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DIP	Doença inflamatória pélvica
DUSP2	<i>Dual specificity protein phosphatase 2</i>
Exp-5	Exportina 5
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HIF1- α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
HOX	Genes homeóticos
HOXA 10	Homeobox A10
HOXA 11	Homeobox A11
HOXA 13	Homeobox A13
HOXA 9	Homeobox A9
IPB	Instituto de Pesquisa Biomédica
JAK2	Janus kinase 2
LH	Hormônio luteinizante
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
pré miRNA	microRNA precursor
pri miRNA	microRNA primário
RISC	<i>RNA induced silence complex</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Science</i>
STAT 3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UDG	Uracil DNA Glycosylase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Genes <i>HOXA</i> e a formação do trato genital feminino.....	26
Figura 2 - Biossíntese dos microRNAs.....	30
Figura 3 - Possível mecanismo para a ação dos miRNAs na patogênese da endometriose.....	34
Figura 4 - Expressão do miRNA135a nas lesões de endometriose	47
Figura 5 - Expressão do miRNA135b nas lesões de endometriose	48
Figura 6 - Expressão do miRNA135a nas diferentes fases do ciclo menstrual	49
Figura 7 - Expressão do miRNA135b nas diferentes fases do ciclo menstrual	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de miRNAs que apresentam alteração na expressão comparado o tecido endometrial ectópico e tópico.	32
Tabela 2 - Sequência nucleotídica dos oligonucleotídeos iniciadores	42
Tabela 3 - Características da amostra	45

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 ENDOMETRIOSE	18
2.1.1 Epidemiologia da endometriose	18
2.1.2 Apresentação clínica.....	19
2.1.3 Etiologia	21
2.1.4 Tratamento.....	24
2.2 HOXA10, UM GENE ONTOGÊNICO.....	25
2.2.1 O gene HOXA10 e a formação do trato genital feminino	26
2.2.2 O gene HOXA10 e endometriose.....	27
2.3 MicroRNAs	28
2.3.1 Os miRNAs e o trato reprodutor feminino	30
2.3.2 Os miRNAs e a endometriose.....	31
2.3.3 O miRNA 135.....	34
2.4 O miR 135 e HOXA10.....	35
3. JUSTIFICATIVA.....	37
4. OBJETIVOS.....	38
4.1 OBJETIVO GERAL	38
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
5. PACIENTES E MÉTODOS	39
5.1 ASPECTOS ÉTICOS	39
5.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	39
5.2.1 Local de realização do estudo	39
5.2.2 Desenho do estudo	40
5.3 PACIENTES E AMOSTRA.....	40
5.3.1 Obtenção das biópsias endometriais e do tecido endometrial ectópico...	41
5.3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	41
5.3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	41
5.4 EXPRESSÃO DOS miRNA 135a e 135b POR PCR EM TEMPO REAL (qPCR)	42
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
6. RESULTADOS.....	45

6.1 EXPRESSÃO DO microRNA 135a E 135b NAS LESÕES DE ENDOMETRIOSE E NO ENDOMÉTRIO TÓPICO	46
6.2 EXPRESSÃO DO microRNA 135a NAS LESÕES DE ENDOMETRIOSE	46
6.3 EXPRESSÃO DO microRNA 135b NAS LESÕES DE ENDOMETRIOSE	47
6.4 EXPRESSÃO DO microRNA 135a NAS DIFERENTES FASES DO CICLO MENSTRUAL	48
6.5 EXPRESSÃO DO microRNA 135b NAS DIFERENTES FASES DO CICLO MENSTRUAL	49
7. DISCUSSÃO	51
8. CONCLUSÃO	57
9. PERSPECTIVAS.....	58
10. REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS	71
ANEXO 1 - APROVAÇÃO COMISSÃO CIENTÍFICA.....	72
ANEXO 2 - APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA – PLATAFORMA BRASIL.....	73
ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	76
ANEXO 4 - QUESTIONÁRIO	78
ANEXO 5 - CLASSIFICAÇÃO REVISADA PELA ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE MEDICINA REPRODUTIVA EM 1997	79
ANEXO 6 - ORIGINAL ARTICLE	81

1. INTRODUÇÃO

A endometriose foi inicialmente descrita em 1860 e hoje, mesmo com diversos estudos publicados, não é possível elucidar ao certo sua etiopatogenia. Sabe-se que é uma doença hormônio dependente e progressiva, e também que sua fisiopatologia sofre influência de fatores ambientais, hormonais, imunológicos e genéticos (1,2,3,4,5).

Muita atenção tem sido voltada para a influência do HOXA10, um gene relacionado à embriogênese do útero, em relação à patogênese da endometriose. Assim como as lesões de endometriose, a expressão deste gene também sofre influência hormonal e tem sua expressão cíclica nas diferentes fases do ciclo menstrual (6, 7, 8).

As maiores taxas de infertilidade e índices mais altos de falha de implantação em pacientes com endometriose podem ser devido a níveis mais baixos de HOXA10 no endométrio destas pacientes, especialmente na fase secretora média do ciclo menstrual. Este mesmo gene tem sua expressão diminuída nas lesões de endometriose em comparação com o endométrio tópico da mesma paciente (9,10,11,12).

MicroRNAs (miRNAs) são pequenas porções não codificadas de RNA que contêm ao redor de 22 nucleotídeos e são essenciais para regulação gênica, sendo capazes de regular vários genes ao mesmo tempo e cada gene pode ser regulado por diferentes miRNAs (13). A ação que cada miRNA desenvolve, está associada com vários processos fisiológicos e a alteração na expressão de miRNAs está envolvida com a patogênese de inúmeras doenças (14).

Vários miRNAs já foram identificados em diferentes órgãos do trato reprodutor feminino e sua expressão relaciona-se ao funcionamento normal deste sistema. Da mesma forma, ao detectar uma expressão anômala de algum miRNA em determinado órgão, poderia haver o desenvolvimento de distintas doenças. Desordens endometriais, tais como, alteração na receptividade endometrial,

sangramento uterino anormal e endometriose parecem ser oriundas de alterações na homeostase molecular e celular do endométrio (15).

Diversos estudos já identificaram miRNAs no endométrio ectópico e sugerem que eles estejam relacionados com a fisiopatologia da endometriose, devido a sua expressão alterada quando comparada com o endométrio tópico (16,17). Mecanismos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento das lesões de endometriose, como adesão celular, migração e proliferação, são, sabidamente, regulados por genes que por sua vez, são regulados por inúmeros microRNAs (18,19).

O miRNA135 (miR135a e miR135b) já foi relacionado com o gene HOXA10 em pacientes com endometriose. Foi demonstrado que pacientes com endometriose têm aumento na expressão deste miRNA enquanto o HOXA10 tem sua expressão diminuída. Também foi observado que o HOXA10 tem sua expressão alterada no endométrio de pacientes com endometriose regulado pelo miRNA135a e 135b, provando o papel do HOXA10 na patogênese da endometriose e sua associação com este miRNA específico (20). O mir135, por também apresentar alteração na sua expressão nas diferentes fases do ciclo menstrual, pode sofrer influência hormonal e pode estar relacionado com alterações na implantação embrionária, que ocorrem no período da janela de implantação (20, 21).

A ação do HOXA10 na endometriose e sua relação com o miR135 já foram demonstradas, no entanto a expressão deste miRNA específico nunca foi analisada no tecido endometrial ectópico.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ENDOMETRIOSE

A endometriose foi, inicialmente, descrita em 1860 e, ainda hoje, não é bem elucidada no que tange a sua etiopatogenia (1). É uma doença progressiva, dependente de estrogênio, que se manifesta pela presença de tecido endometrial (epitélio glandular e/ou estroma) fora da cavidade uterina, sendo que os locais mais frequentes de implantação são as vísceras pélvicas e o peritônio. O aspecto das lesões e o tamanho podem variar, desde lesões microscópicas ou pequenos pontos avermelhados na superfície peritoneal até cistos endometrióticos maciços que distorcem a anatomia tubo ovariana e formam extensas aderências. A forma grave da doença pode envolver bexiga, intestino, ureter, septo retovaginal e, até mesmo, órgãos não pélvicos, como pulmão, pericárdio e cérebro (2).

2.1.1 Epidemiologia da endometriose

A prevalência da doença não é exatamente conhecida, pois o estudo histopatológico por meio de cirurgia é fundamental para o seu diagnóstico. No entanto, estima-se que a endometriose afete de 5 a 10% das mulheres em idade reprodutiva e de 35 a 50% das mulheres que apresentam dor pélvica, infertilidade ou ambos (3,4,5). A maior incidência é, sem dúvida, na menacme, mas já foi descrita em adolescentes e, também, em mulheres na pós-menopausa (22).

O diagnóstico pode levar muitos anos para ser estabelecido, pois a variedade de sinais e sintomas são fatores de confusão com outras doenças. A média de tempo para diagnóstico é de 11,7 anos nos Estados Unidos e 8 anos no Reino Unido (23).

A alta prevalência desta doença chama a atenção para os gastos em saúde pública que se tornam cada vez mais altos, assemelhando-se a outras doenças crônicas, como diabetes mellitus e artrite reumatoide (24).

Os fatores de risco incluem menarca precoce, ciclos menstruais de curta duração, menstruação com fluxo mais intenso e de maior duração, aspectos estes relacionados com maior chance de fluxo retrógrado (25, 26, 27). Tem sido, ainda, relacionado com mulheres caucasianas altas e magras mais susceptíveis ao estresse, e que fazem uso abusivo do álcool e cafeína (28). A história familiar também é um importante fator de risco. Um estudo avaliou 750 mulheres com endometriose e constatou um risco aumentado de 5,2 vezes para irmãs e 1,56 vezes para primas, sejam essas de origem maternas ou paternas. Outro estudo mostra um risco 7,2 vezes maior entre mães e filhas (29). Constata-se que há na literatura uma grande discrepância nos dados epidemiológicos referentes à incidência e prevalência da endometriose.

Alguns estudos referem que mulheres com endometriose apresentam um maior risco de desenvolver neoplasias pélvicas. Os tumores ovarianos, principalmente de células claras, são os mais associados à endometriose, no entanto, diversos estudos já buscaram relacionar a endometriose com tumores de mama, linfoma não Hodgkin e melanoma (30, 31, 32, 33, 34, 35).

2.1.2 Apresentação clínica

A principal sintomatologia apresentada é dor representada pela dismenorreia, dispareunia ou, mesmo, dor pélvica crônica. Além disso, a dor, muitas vezes, vem acompanhada de infertilidade. Entretanto, a doença pode se apresentar de forma assintomática sendo achado ocasional em pacientes submetidas a cirurgia por outras causas.

A dor pode ser causada por inflamação peritoneal local, infiltração profunda com lesão tecidual, formação de aderências, espessamento fibrótico, e presença e acúmulo de sangue menstrual nos implantes endometrióticos (36, 37).

A dismenorreia pode ser primária ou secundária. Um fator de forte suspeição são mulheres adultas que iniciam com dor após anos sem apresentar esta queixa. A dor nem sempre é localizada no baixo ventre, pois a distribuição da doença na cavidade pélvica pode levar a sintomas locais por envolvimento intestinal, vesical e ureteral (2).

A dispareunia, frequentemente, ocorre devido ao comprometimento do fundo de saco vaginal, comprometimento do septo reto vaginal ou por aderências pélvicas que causam desconforto, principalmente na penetração profunda. Pacientes com comprometimento vesical ou ureteral podem apresentar hematúria e aquelas com comprometimento intestinal podem apresentar sangue nas fezes, constipação e dor ao evacuar. Estes sinais e sintomas não são restritos ao período menstrual (2).

O exame físico pode levantar algumas suspeitas, mas há casos em que o exame físico é completamente normal. O exame pélvico pode revelar nódulos no fundo de saco posterior, dor à mobilização do útero, ou mesmo imobilidade com retrofixação devido a aderências ao fundo de saco. Os anexos podem estar dolorosos e aumentados de volume pela presença de endometriomas. Implantes endometrióticos, muitas vezes, podem ser vistos no colo uterino, fundo de vagina, em cicatriz de cesárea ou outra cirurgia pélvica abdominal (2).

Além do exame clínico, a ultrassonografia transvaginal ou transretal pode ajudar no diagnóstico por meio da visualização não apenas dos endometriomas, mas também dos nódulos intestinais ou espessamento nos ligamentos útero sacros. A ressonância magnética apresenta a mesma capacidade diagnóstica que a ultrassonografia transvaginal e transretal para diagnóstico de endometriose intestinal, mas parece ter maior sensibilidade no diagnóstico de endometriose no ligamento útero sacro e no septo reto vaginal (38, 39, 40).

O principal marcador sérico que parece ter alguma relação com a endometriose é o CA-125. É um marcador encontrado em estruturas derivadas do epitélio celômico e comum à maioria dos carcinomas ovarianos epiteliais não mucinosos. Sua expressão parece estar aumentada em endometriose grave, mas não tem relação com o diagnóstico da doença. O CA-125 é útil no seguimento da paciente, pois o aumento do nível sérico sugere recorrência da doença (41).

2.1.3 Etiologia

Muitos estudos já foram realizados na tentativa de elucidar por completo a fisiopatologia desta doença, porém o desenvolvimento preciso ainda não é bem compreendido. Atualmente, há evidências de que há envolvimento de componentes ambientais, hormonais, imunológicos e genéticos (2). Existem diversas evidências que comprovam que a endometriose tem um componente genético e é influenciada por fatores epigenéticos e células tronco (42,43). A fundamentação para explicar essa possível fisiopatologia tem sido cada vez mais estudada, uma evidência dessa relação genética é a maior incidência de endometriose (até 7 vezes) em parentes de primeiro grau de portadoras da doença. Esta maior incidência também foi demonstrada em gêmeas monozigóticas (29,44,45).

Existem diversas teorias para explicar a patogênese da doença, entre elas:

a) Menstruação retrógrada: Proposta por Sampson em 1921, ainda hoje, é a teoria mais aceita. Baseia-se na suposição de que a endometriose é causada pela implantação de células endometriais por regurgitação transtubária durante a menstruação. Entre os achados que sustentam essa teoria está a presença de células endometriais no líquido peritoneal em 59-79% das mulheres durante a menstruação, comprovando a menstruação retrógrada, sendo mais comum em pacientes com endometriose e a maior frequência da doença nas porções inferiores da pelve em que as células refluídas chegariam mais facilmente (46, 47, 48, 49, 50).

No entanto, algumas evidências atuais corroboram contra essa teoria, pois a menstruação retrógrada ocorre em 90% das mulheres, enquanto a prevalência de endometriose é ao redor de 10%. Além disso, as células endometriais ectópicas são, funcionalmente, diferentes das células endometriais tópicas e não há nenhuma comprovação de que as células endometriais encontradas no fluido peritoneal sejam capazes de formar implantes na superfície peritoneal (51, 52, 53).

b) Metaplasia Celômica: Baseia-se na transformação do epitélio celômico, que são células totipotenciais, em tecido endometrial. Irritações repetidas do epitélio celômico, associada a uma variedade de fatores comuns, como estímulos hormonais ou infecciosos, podem induzir células celômicas a essa diferenciação. Esta teoria não obteve forte suporte científico, mas pode contribuir em algum grau (54, 55, 56).

c) Teoria da Indução: Propõe que fatores bioquímicos endógenos possam induzir a transformação de células peritoneais indiferenciadas em tecido endometrial. Não foi comprovada em mulheres e primatas, porém foi demonstrada em coelhas (57, 58).

d) Embriológica: Foi descrita no final do século XIX por Von Recklinghausen e Russell, e pressupõe que a endometriose se originaria de restos celulares remanescentes dos ductos de Wolff ou dos ductos de Müller, os quais, por meio específico, sofreriam um processo de metaplasia e transformar-se-iam em tecido endometrial. Essa explicação seria plausível se considerarmos os raros casos de endometriose encontrada em homens (59, 60).

e) Disseminação linfática e hematogênica: Estas teorias foram propostas para explicar a presença de endometriose em locais fora da cavidade peritoneal. Seria como uma disseminação metastática por meio do sistema linfático ou hematopoiético. Esta teoria poderia explicar a endometriose encontrada em órgãos distantes da cavidade pélvica como cérebro e pulmão (61).

f) Fator ambiental: Fatores ambientais envolvidos com o desenvolvimento da endometriose têm sido amplamente estudados em modelos de primatas. Macacas expostas à radiação e à dioxina desenvolveram endometriose, mas a aplicabilidade destes achados ainda não foi confirmada em humanos (62,63). Os químicos mais associados ao desenvolvimento da endometriose por exposição ambiental são os compostos que simulam ação estrogênica (64).

g) Fator imunológico: Acredita-se que os fatores imunes também estejam envolvidos neste processo. A doença pode se desenvolver em virtude da redução da eliminação imune de células endometriais viáveis da cavidade pélvica, por redução da atividade das células NK ou pela ativação da atividade dos macrófagos, com redução da fagocitose, podendo explicar essa contribuição (72,73,74). Além disso, o fluido peritoneal de mulheres com endometriose apresenta altas concentrações de citocinas, fatores de crescimento e fatores angiogênicos, derivados das lesões, de produtos secretados pelos macrófagos e por outras células do sistema imune que mediam a resposta inflamatória e contribuem para o estabelecimento da doença (74,75,76,77).

h) Fator genético: Nos últimos anos, o fator genético na etiopatogenia da endometriose tem sido amplamente discutido. Inicialmente, como já citado anteriormente, a importância da história familiar na incidência da doença mostra que há um componente genético envolvido. Não foi identificado um padrão de herança Mendeliano específico, postulando uma herança multifatorial. Além disso, já foram descritos polimorfismos do gene do receptor do estrogênio e a deleção de um exon em vários mRNA do receptor de progesterona envolvidos com a endometriose (65,66). Alguns estudos mostram aneuploidias dos cromossomos 11, 16 e 17 em tecidos endometrióticos e perda da heterozigossidade em um ou mais locais dos cromossomos 9, 11 e 22 quando comparado ao endométrio eutópico de pacientes com e sem endometriose (67,68,69,70,71). Estes achados sugerem o envolvimento genético ainda pouco elucidado que está presente no desenvolvimento e na progressão da doença.

Nos últimos anos, tem-se discutido a ação do HOXA10, um gene sabidamente importante na formação do sistema reprodutor feminino, na etiopatogenia da endometriose. Este fator será amplamente discutido a seguir.

2.1.4 Tratamento

O tratamento deve ter dois objetivos: aliviar os sintomas de dor ou restaurar a fertilidade (ou melhorar a infertilidade). É possível que o objetivo seja tratar ambos os sintomas.

As formas de tratamento incluem a cirurgia com cauterização e/ou exérese das lesões e/ou o uso de fármacos que atuam inibindo a hipófise. No entanto, até hoje, nenhum tratamento se mostrou 100% eficaz, conferindo uma alta taxa de recorrência à doença (2,78). A taxa de recorrência é dependente do estágio da doença, tempo de evolução e tipo de abordagem terapêutica prévia. A taxa de recorrência é ao redor de 5-20% em um ano, chegando a 40% após cinco anos (79,80,81,82,83).

O objetivo do tratamento cirúrgico é excisar ou coagular todos os focos da doença e promover a lise das aderências por ela causadas utilizando tesoura ou diferentes meios de energia. O procedimento cirúrgico deve ser o mais radical possível, para restabelecer a anatomia e o menos radical possível na preservação da fertilidade, das pacientes que desejam gestar. Nas pacientes com endometrioma, é importante a ressecção da cápsula evitando, sempre que possível, a cauterização do parênquima ovariano normal. A primeira opção cirúrgica é a videolaparoscópica pelo menor custo, pela menor morbidade e pela menor formação de aderências.

Atualmente, é inaceitável a abordagem cirúrgica apenas com o intuito diagnóstico, devendo essa sempre ter caráter curativo com ampla toaleta pélvica.

Medicamentos usados para suprimir a função ovariana, e limitar o crescimento e a atividade das lesões incluem androgênios, progestogênios, e, principalmente, os agonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e os contraceptivos hormonais. A grande maioria dos tratamentos é superior ao placebo na melhora da dor (84,85,86,87,88). Tratamentos para dor com analgésico comum não costumam ser eficazes (84).

O objetivo da terapia medicamentosa é inibir os focos da doença por meio da supressão estrogênica. Essa inibição leva à atrofia dos implantes endometriais ectópicos, e interrompe o ciclo de sangramento e hemorragia.

A administração contínua ou convencional de contraceptivo hormonal oral combinado é a forma mais comum de tratamento clínico. O tratamento visa causar uma hipotrofia endometrial ou amenorreia por induzir uma pseudogravidez. O tratamento deve ser mantido por, pelo menos, 6 a 12 meses para mostrar eficácia.

O uso de progestogênios objetiva um efeito antiendometriótico por meio da decidualização inicial do tecido endometrial seguida por atrofia. Além disso, tem menor custo e menos efeitos colaterais que outras opções de tratamentos (89). Os derivados isoxazol da 17-alfa-etinilttestosterona e os nor-esteroides insaturados determinam efeito antigonadotrófico sobre o sistema nervoso central e uma ação antiestrogênica periférica, diminuindo os receptores endometriais para estrogênio e progesterona (90,91).

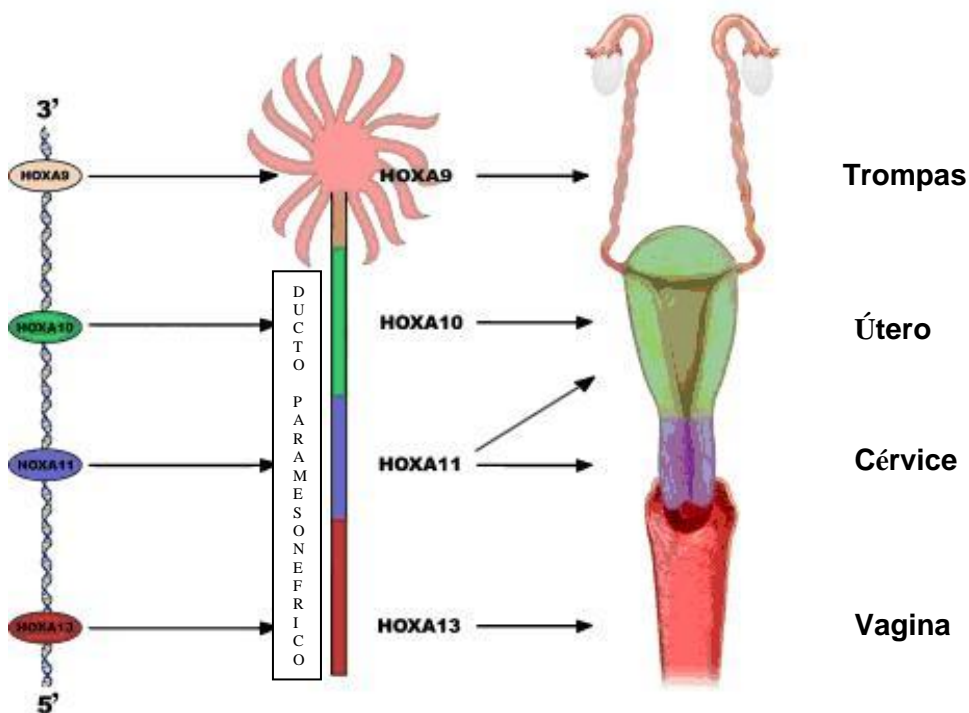
Os agonistas do GnRH ligam-se aos receptores do GnRH e, inicialmente, causam aumento do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) (efeito inicial estimulatório sobre a hipófise conhecido como efeito *flare up*). Por terem meia-vida mais longa que o GnRH, acabam por causar uma exposição contínua dos receptores ao agonista, e conseqüente hipofisectomia medicamentosa para o FSH e LH. Dessa forma, a produção ovariana de estrogênios é suprimida causando uma pseudomenopausa, e por sua vez, leva à perda dos receptores hipofisários levando a uma queda nos níveis de FSH e LH.

2.2 HOXA10, UM GENE ONTOGÊNICO

O gene HOXA10 (homeobox A10) faz parte da família dos genes HOX que tem importante função na formação anatômica e funcional de determinados segmentos do corpo durante a ontogênese (10,11,12). Os genes HOX controlam o desenvolvimento e a diferenciação posicional das células no embrião. Agem por meio da codificação de fatores de transcrição que determinam a ativação ou inativação de inúmeros genes à jusante levando ao desenvolvimento das estruturas anatômicas. Em humanos, os genes HOX são divididos em quatro grupos em cada grupo há entre 9 e 13 genes, distribuídos em diferentes cromossomos. A interação entre estes grupos confere uma valiosa combinação genética para determinar os segmentos anatômicos corpóreos (29,44,45,92,93).

2.2.1 O gene HOXA10 e a formação do trato genital feminino

O gene HOXA10 (juntamente com o HOXA9, HOXA11 e HOXA13) regula a diferenciação dos ductos Mullerianos em órgãos genitais adultos (Figura 1). A formação do sistema reprodutor feminino se dá a partir dos ductos paramesonéfricos ou de Muller que, na ausência do cromossomo Y e de testículo funcional, determinará a ausência do fator inibidor Mulleriano, permitindo a diferenciação dos ductos de Muller. A formação da genitália interna inicia por volta da 8ª semana de desenvolvimento embrionário. A genitália interna é finalizada entre a 18ª e 22ª semana de gestação com a fusão dos ductos de Muller que dará origem ao útero e aos dois terços superiores da vagina (6). A contribuição do gene HOXA10, neste desenvolvimento, está limitada ao útero.



Fonte: Imagem gentilmente cedida por Zanatta et al, 2010

Figura 1- Genes *HOXA* e a formação do trato genital feminino.

O gene HOXA10 está envolvido na embriogênese do epitélio, do estroma e da musculatura uterina, tendo menor expressão no miométrio (6,7). A regulação da expressão dos genes HOX durante a embriogênese parece ocorrer sob influência do

estrogênio. Ratas com deficiência em receptores estrogênicos não apresentaram desenvolvimento uterino adequado (94).

No endométrio, o gene HOXA10 é expresso de forma cíclica, e sofre influência do estrogênio e progesterona. Está expresso no epitélio e estroma durante todo o ciclo menstrual, mas sua maior expressão se dá durante a janela de implantação (fase secretora média) (10). Nas células endometriais, o gene HOXA10 exerce uma função semelhante à exercida na organogênese, pois o tecido funcional surge a partir de células indiferenciadas a cada mês. De forma geral, os genes HOX regulam a diferenciação e proliferação celular no adulto reproduzindo o que ocorre na embriogênese. Durante o período menstrual, ocorre, a cada novo ciclo, um período de proliferação celular, seguido por diferenciação, tornando o endométrio receptivo para implantação. Quando a implantação não ocorre, o endométrio entra em uma fase de apoptose e descamação (95).

A ação do gene HOXA10 no momento crítico da implantação do embrião ocorre por regulação dos hormônios esteróides que se ligam a receptores endometriais e ativam a transcrição deste gene que regula a diferenciação celular, resultando em um endométrio receptivo para a implantação embrionária (96).

2.2.2 O gene HOXA10 e endometriose

A etiologia ainda desconhecida da endometriose tem, entre suas teorias, a metaplasia celômica, na qual o epitélio celômico, distribuído aleatoriamente na pelve durante o desenvolvimento embrionário, sofreria modificações. Estas alterações levariam a futuros focos de endometriose, os quais seriam resultantes da metaplasia das células mesenquimais estimuladas pelo estradiol a partir da puberdade (97). Essa teoria ganha força quando se constata que a localização mais comum dos focos de endometriose se dá nos remanescentes dos ductos de Muller e que o epitélio celômico tem a capacidade de se diferenciar em tecido endometrial (98).

Pacientes com endometriose apresentam níveis menores de expressão do HOXA10 no endométrio tópico no período da janela da implantação. Esta baixa expressão pode justificar a falha de implantação detectada nas pacientes com endometriose e explicar a infertilidade neste grupo (9). A endometriose e a

consequente falha de implantação levando à infertilidade foram demonstradas em camundongos fêmeas com ausência do gene HOXA10, nos quais os embriões normais não eram capazes de implantar, no entanto, os embriões mutantes eram capazes de se implantar em outro útero (99).

A presença do HOXA10 no tecido endometriótico sugere que a expressão deste gene é necessária para o desenvolvimento do “novo” tecido endometrial. Desta forma, fica claro que esta relação não é necessária somente para a reestruturação do endométrio tópico a cada ciclo menstrual, mas também para a formação do tecido endometrial ectópico (12).

A expressão do gene HOXA10 no endométrio ectópico existe até mesmo em lesões que não se encontram em locais nos quais este gene é essencial para a embriogênese. Sua expressão foi detectada no peritônio pélvico, nos endometriomas ovarianos e, até mesmo, no parênquima pulmonar (12).

Esta expressão foi demonstrada no epitélio e estroma das lesões de endometriose, e sua expressão está diminuída quando comparada ao endométrio tópico, sugerindo um papel para este gene na patogênese desta doença (9,10,11,12).

2.3 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas porções de RNA de fita simples, com cerca de 22 nucleotídeos não codificadores, e são reguladores da transcrição gênica e de genes envolvidos na transdução de sinais, podendo controlar diversos genes ao mesmo tempo (13). Cada miRNA está associado a diversos processos fisiológicos, como apoptose, diferenciação, hematopoiese, entre outros. A tradução é inibida pela ligação do miRNA na região 3' não traduzida do RNA mensageiro do gene-alvo ou por degradação do mRNA (100). As suas funções ainda não estão totalmente esclarecidas, mas foi comprovado que a desregulação dos miRNAs está implicada em diversas doenças, principalmente a diferentes tipos de câncer, possivelmente por estarem fortemente envolvidos em funções celulares, tais como crescimento celular, diferenciação e apoptose (14). Esse mecanismo se dá pela habilidade de controlar a expressão gênica em nível pós-transcrição por

degradação, repressão ou silenciamento da ação do gene-alvo (101,102,103,104,105).

O primeiro miRNA foi descoberto em 1993 por Lee *et al.* (106), denominado como Lin4. Foi associado à regulação do desenvolvimento temporal do estágio larval no nematoide *Caenorhabditis elegans*. Desde então, milhares de miRNAs já foram descobertos e estima-se que esse número cresça ainda mais.

A formação de um miRNA inicia na transcrição do gene do miRNA pela enzima RNA polimerase II gerando um transcrito de miRNA primário conhecido como pri miRNA. Este transcrito apresenta uma estrutura tipo *hairpin* (ou grampo de cabelo), que, com pares de bases intramoleculares emparelhadas, formam uma dupla hélice. Essa estrutura é processada pela enzima RNase III, conhecida como Drosha, formando uma molécula de miRNA precursor (pré-miRNA) que contém 70 nucleotídeos. O pré-miRNA é transportado ao citoplasma pela exportina-5 (Exp-5) para ser processada por uma segunda enzima RNase III, conhecida como Dicer, que cliva as moléculas de RNA de dupla hélice, gerando um miRNA de fita dupla com 22 nucleotídeos. Uma das fitas deste produto é incorporada a um complexo multimérico denominado RISC (*RNA induced silence complex*), composto pelas proteínas Argonautas - proteínas catalizadoras, que irão controlar a expressão pós-transcricional do gene-alvo. Especula-se que a expressão alterada dos componentes dessa cadeia de formação seja responsável pelo aparecimento de diferentes tumores e doenças (107,108,109,110,111,112) (Figura 2).

A forma como cada miRNA regula seu gene-alvo (geralmente inibindo a síntese proteica) depende do grau de complementaridade com o mRNA do gene-alvo. Se a sequência do miRNA for pequena e não necessitar pareamento completo, um único miRNA é capaz de regular muitos mRNAs de genes-alvo. Isso forma uma complexa e enorme rede reguladora de sinalização celular (113,114).

Um miRNA específico, quando exerce uma regulação positiva em determinado gene, estará reprimindo sua função. Por outro lado, se essa regulação for negativa, o gene-alvo terá sua expressão aumentada. É, na verdade, um efeito combinado de múltiplos miRNAs que irá definir a existência de uma determinada doença (16).

Programas computadorizados que fazem a predição de qual gene é codificado pelo miRNA indica que até 30% de nossos genes são alvos de miRNAs e que estes compõem de 1 a 5% do genoma humano. Cada miRNA pode ter como alvo uma média de 100-200 genes e, por outro lado, cada gene pode ter regiões que podem ser codificadas por diversos miRNAs (101,102,103,104,115).

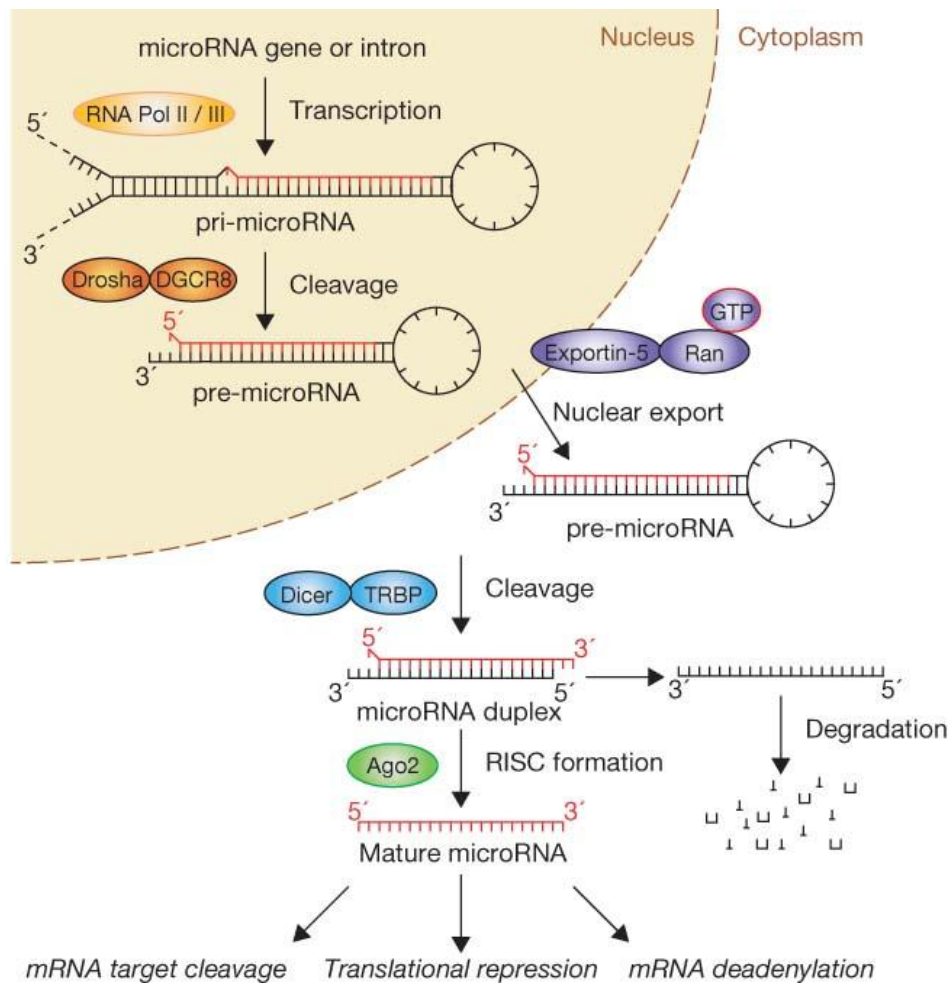


Figura 2- Biossíntese dos microRNAs (116)

2.3.1 Os miRNAs e o trato reprodutor feminino

O trato reprodutor feminino tem características únicas principalmente voltadas para suas funções cíclicas e de regeneração celular mensal. Para um desenvolvimento adequado de todas essas funções, inúmeros fatores de

transcrição, pós-transcrição e tradução devem estar envolvidos, e os miRNAs estão fortemente ligados a esse processo (15).

A fisiologia do trato reprodutor feminino, que inclui o eixo hipotálamo-hipófise-ovário tem sido exaustivamente estudada. Recentemente, diversos estudos foram capazes de identificar inúmeros miRNAs que estão envolvidos na regulação desta função, e muitos deles vêm usando camundongos mutantes para Dicer (enzima que está envolvida na biogênese dos miRNAs) para verificar quais miRNAs estariam ausentes. Estes estudos revelaram que a presença de determinados miRNAs é essencial para o desenvolvimento e funcionamento normal do trato reprodutor (117).

Em humanos, já foi descrita a expressão de diversos miRNAs no ovário, oviduto, endométrio, miométrio e colo uterino, tanto nos tecidos normais assim como em patologias que envolvem estes órgãos. Os achados ajudam, não somente a identificar quais os miRNAs estão envolvidos no funcionamento normal, mas, principalmente, auxiliam a entender a etiologia de diversas patologias que podem ser explicadas por alterações neste perfil. O entendimento futuro desta cadeia visa elucidar quais os reais mecanismos de cada miRNA que estariam associados a cada patologia e como a intervenção, voltada para inibir ou estimular a ação destes miRNAs, poderia alterar o aparecimento de determinadas doenças (15).

2.3.2 Os miRNAs e a endometriose

Existem diversas funções celulares que ocorrem de forma fisiológica no endométrio cíclico e no estabelecimento da endometriose que já foram relacionadas a miRNAs, sugerindo uma possível função destes na regulação da expressão gênica no endométrio e/ou nas desordens relacionadas a este (105).

Diversos estudos identificaram diferentes miRNAs no tecido endometrial ectópico e sugerem que estejam relacionados com a fisiopatologia da endometriose por apresentarem expressão alterada quando comparados ao tecido endometrial tópico (Tabela 1) (16,17).

Tabela 1 - Exemplos de miRNAs que apresentam alteração na expressão comparando o tecido endometrial ectópico e tópico.

microRNA	Expressão	Tecido	Referência	microRNA	Expressão	Tecido	Referência
1	+	Não especificado	16	133b	+	Não especificado	135
16	-	Não especificado	16,105	142-3p	-	Não especificado	16
21	-	Não especificado	16,105	146b	-	Não especificado	105
22	-	Não especificado	105	15b	-	Não especificado	16,105
24	-	Não especificado	105	17-5p	+	Não especificado	105
25	-	Não especificado	135	193b	-	Não especificado	105
26	-	Não especificado	16	196b	-	Não especificado	16,135
93	-	Não especificado	135	199a	-	Não especificado	16,105
100	-/+	Não especificado	16,105	19b	-	Não especificado	105
103	-	Não especificado	105	200a	-	Não especificado	16
107	-	Não especificado	105	200b	-	Não especificado	16,135
126	-/+	Não especificado	16,105	200c	-	Não especificado	135
138	+	Vários	134	202-3p	+	Vários	134
141	-	Não especificado	16	20a	-/+	Não especificado/Endometrioma	16,133
143	-/+	Não especificado	16,105	23a	-	Não especificado	105
145	-/+	Não especificado	16,105	23b	-	Não especificado	105
150	+	Não especificado	16	26a	-	Não especificado	105
183	-	Não especificado	135	27b	-	Não especificado	105
191	-	Não especificado	105	29a	-	Não especificado	105
194	+	Não especificado	16	29c	+	Não especificado	16
195	-	Não especificado	105	29c-3p	+	Vários	134
202	+	Não especificado	135	30a-5p	-	Não especificado	105
203	-	Não especificado	135	30b	+	Não especificado	105
214	-	Não especificado	105	30c	-	Não especificado	105
215	-	Não especificado	135	30d	-	Não especificado	105
221	-	Não especificado	105	30e-5p	-	Não especificado	105
222	-	Não especificado	105	343-3p	-	Não especificado	135
223	+	Não especificado	16	34c	-	Não especificado	16
224	+	Não especificado	135	361-3p	+	Não especificado	135
342	-	Não especificado	105	362-3p	-	Não especificado	135
363	-	Não especificado	135	518e	+	Não especificado	135
365	+	Não especificado	16	519a	+	Não especificado	135
381	+	Não especificado	135	519b-5p	+	Não especificado	135
411	+	Vários	134	519c-5p	+	Não especificado	135
412	+	Não especificado	135	520d-5p	+	Não especificado	135
423	+	Não especificado	105	551b	+	Não especificado	135
424	-	Não especificado	16	574-5p	+	Não especificado	135
425	-	Não especificado	135	5p	+	Vários	134
451	+	Não especificado	105	615-3p	+	Não especificado	135
522	+	Não especificado	135	628-3p	+	Não especificado	135
523	+	Não especificado	135	663b	+	Não especificado	135
622	+	Não especificado	135	92a	-	Não especificado	135
637	+	Não especificado	135	99a	+	Não especificado	16
941	+	Não especificado	135	99b	+	Não especificado	16
1469	+	Não especificado	135	BHRF1-2	+	Não especificado	135
1470	+	Não especificado	135	let 7(a,b,c,d,f,i)	-	Não especificado	105,135
1909	+	Não especificado	135	Plus-E1031	-	Não especificado	135
1915	+	Não especificado	135	Plus-F1038	+	Não especificado	135
24-1	-	Não especificado	135	Plus-F1042	+	Não especificado	135
106b	-	Não especificado	135	Plus-F1221	+	Não especificado	135
10b	-	Não especificado	105	Plus-F1223	+	Não especificado	135
125a	-/+	Não especificado	16,105	Plus-F1231	-	Não especificado	135
125b	-/+	Não especificado	16,105				

Ao analisar a expressão dos miRNAs nas pacientes com endometriose e relacionar com as vias (que mediam inflamação, remodelamento tecidual, apoptose, proliferação celular, angiogênese e cicatrização) que eles coordenam, observa-se que há uma importante diferença no tecido endometrial tópico e no ectópico (118).

A maioria dos miRNAs identificados mostra-se menos expressa nas pacientes com endometriose quando comparadas com pacientes livres da doença (16,115).

A diferença dos miRNAs entre o tecido endometrial tópico e o ectópico já encontrada estão relacionadas à codificação de proteínas por diferentes genes envolvidos na adesão celular, remodelamento da matriz extracelular, migração e proliferação, regulação do sistema imune, além de diversos mecanismos relacionados diretamente com o estabelecimento dos implantes endometriais, tais como adesão das células endometriais no peritônio, invasão, e proliferação no mesotélio e sobrevivência das células endometriais ectópicas (18,19).

Não somente analisando as diferentes expressões dos miRNAs em tecido tópico e ectópico, pesquisas têm sido realizadas na tentativa de elucidar os mecanismos mediados por miRNAs que podem estar envolvidos na patogênese da endometriose.

Ohlsson Teague *et al.* (118) publicaram um estudo no qual analisaram diversos processos fisiológicos envolvidos com o aparecimento de lesões de endometriose e os relacionou aos miRNAs. Sinais de hipóxia, presente no tecido endometrial ectópico, são induzidos pela proteína ligadora de CREB (CREBBP) e por HIF1- α , estes cofatores estão aumentados devido à supressão de dois miRNAs que fazem regulação negativa sobre esses fatores, o miR20 e o miR200. A inflamação, que é fortemente mediada pela COX-2, está aumentada no tecido ectópico e pode ser explicada pela diminuição da expressão do miR199a e miR16, que são responsáveis por suprimir a tradução da COX-2. Com uma diminuição do efeito supressor da COX-2 mediadas por estes miRNAs, haverá um aumento do processo inflamatório. Outros eventos, tais como remodelamento tecidual, crescimento celular, proliferação, angiogênese e remodelamento da matriz extracelular, que estão fortemente relacionados ao aparecimento da endometriose, também tiveram seu funcionamento alterado devido a diferentes expressões de miRNAs envolvidos na regulação destas ocorrências.

Estes achados sugerem que os miRNAs exerçam um efeito importante na patogênese da doença, seja pela evidência de que regulam vias comprovadamente envolvidas seja pelas diferentes expressões observadas quando o tecido endometrial tópico é comparado com o ectópico (Figura 3).

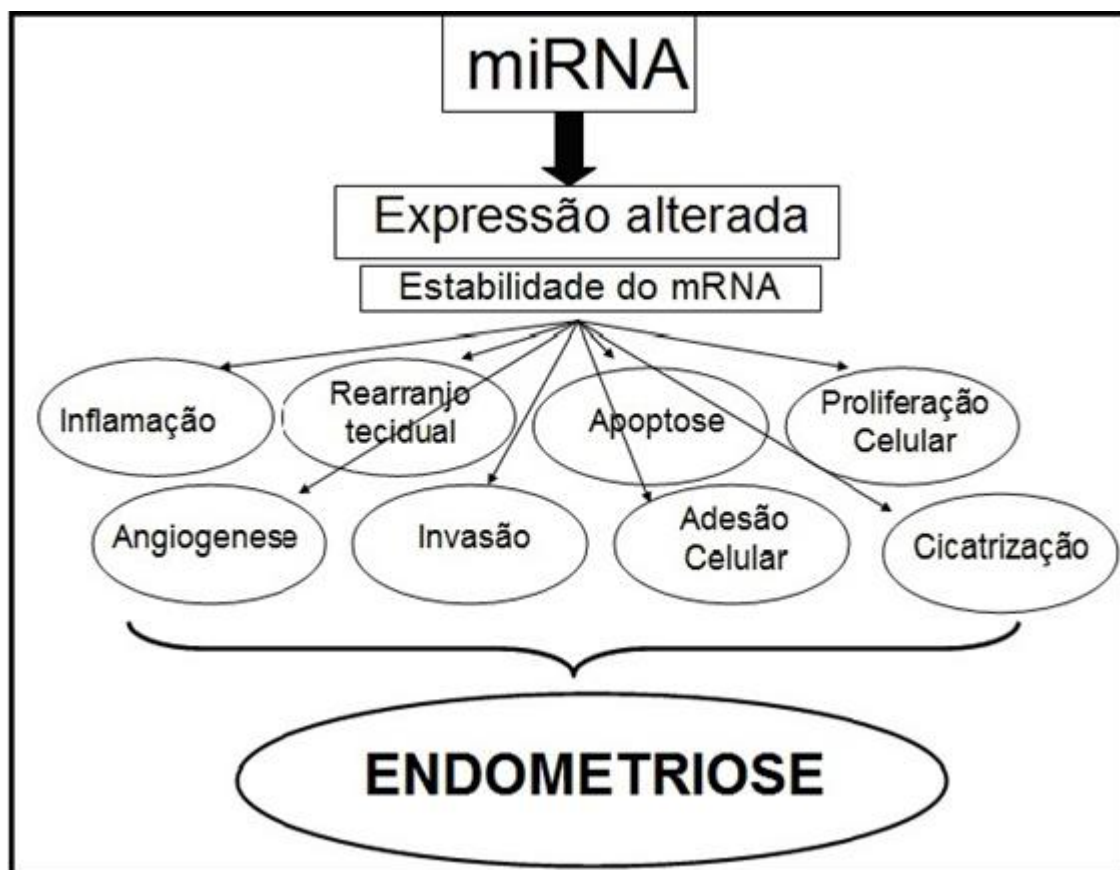


Figura 3- Possível mecanismo para a ação dos miRNAs na patogênese da endometriose

2.3.3 O miRNA135

O miRNA135 (miR135) é dividido em dois subtipos; 135a e 135b. Até o momento, a maior parte dos estudos avaliaram a expressão de um dos tipos deste miRNA, sugerindo que eles regulam diferentes genes-alvo.

O miRNA135a, assim como muitos outros miRNAs, já foi fortemente associado a neoplasias. Parece estar envolvido com apoptose por regular a JAK2, uma tirosina quinase citoplasmática envolvida no controle dos efeitos antiapoptóticos do gene Bcl-x_L, que promove a sobrevivência das células do linfoma de Hodgkin

clássico e no prognóstico dessa doença. A supressão da ação da JAK, além de diminuir a expressão do Bcl-x_L, leva à repressão da ativação da p-STAT3, reduz a ciclina D1 e inibe a proliferação de células relacionadas ao câncer gástrico (119,120). O miR135a está envolvido na regulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e, conseqüentemente, com o controle da pressão arterial por regular os níveis dos receptores mineralocorticoides (121). Outro de seus efeitos relacionados a processos fisiológicos é sua importância na primeira clivagem celular no estágio de zigoto, podendo sugerir que possa ter alguma função na implantação embrionária (122).

O miRNA135b foi identificado como responsável pelo controle da diferenciação osteogênica e osteoblástica em células-tronco somáticas por regular a expressão de genes relacionados ao osso (123). Seu efeito como mediador de oncogenicidade produziu um imunofenótipo de linfoma de células gigantes. Sua inibição mostra redução da angiogênese tumoral e do crescimento *in vivo*, mostrando sua importância terapêutica (124).

O miRNA135a e b foram relacionados ao gene supressor tumoral *APC* (*adenomatous polyposis coli*), que está fortemente relacionado à fisiopatologia do câncer de cólon. Uma regulação positiva destes miRNAs foi observada em adenoma e carcinoma colorretal, o que leva a baixos níveis de mRNA *APC* e a maior chance de desenvolvimento da doença (125).

2.4 O miR135 e HOXA10

A relação do microRNA com o HOXA10 foi detectada em pacientes com câncer de mama, provando seu efeito regulador sobre a migração e invasão celular, e seu papel como mediador da oncogênese dessa neoplasia (126).

Mais profundamente estudada, foi a relação previamente identificada do miRNA135 (miR135a e miR135b) com o gene HOXA10 em pacientes com endometriose. Foi visto que a expressão deste miRNA está aumentada em pacientes com endometriose, enquanto a expressão do HOXA10 é reduzida. Além disso, experimentos comprovaram que o aumento ou a redução da expressão dos miR135a e miR135b no endométrio tóxico está inversamente relacionado(a) com a

expressão do HOXA10, comprovando o papel regulador deste gene por meio de sua associação com este miRNA específico (20).

Ainda foi observado que a expressão destes miRNAs está aumentada em determinadas fases do ciclo menstrual e apresenta especificidade celular, pois a mesma alteração não foi detectada em diferentes tipos celulares. A variação na expressão deste miRNA pode sugerir que alterações detectadas precocemente no ciclo menstrual podem estar relacionadas a defeitos de implantação que ocorrem na fase secretora, ou seja, na janela de implantação (20,21).

A expressão do HOXA10 nas lesões de endometriose já foi verificada e está diminuída quando comparada com o endométrio tóxico. Da mesma forma, a relação do HOXA10 com o miRNA135a e miRNA135b também já foi avaliada no endométrio tóxico de pacientes com endometriose. No entanto, a expressão deste microRNA específico (135a e 135b) nunca foi analisada nas lesões de endometriose.

3. JUSTIFICATIVA

Frente à importância do HOXA10 na patogênese da endometriose e sua importante relação com implantação embrionária, avaliamos o já estudado sobre a relação deste gene com o microRNA135a e 135b. Desta forma, temos o miRNA135 (a e b) como um alvo a ser pesquisado na tentativa de elucidar a fisiopatologia desta complexa patologia. Considerando que o endométrio tópico e ectópico possuem diversas características que os diferem, além de verificar se os miRNA135a e miRNA135b são expressos no endométrio ectópico, buscamos investigar se há alteração na expressão destes microRNAs nos diferentes tecidos e sua expressão nas diferentes fases do ciclo menstrual.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão dos microRNA135a e 135b no endométrio ectópico e tópico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a expressão do miRNA135a e 135b no endométrio ectópico.
 - Descrever a expressão do miRNA135a e 135b no endométrio tópico.
 - Comparar a expressão do miRNA135a e 135b no endométrio ectópico com a expressão no tecido endometrial tópico.
 - Avaliar a expressão do miRNA135a e miRNA135b no endométrio tópico e ectópico nas diferentes fases do ciclo menstrual.
-

5. PACIENTES E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa seguiu os princípios éticos estabelecidos de acordo com a resolução número 466 do Conselho Nacional de Saúde de 12 de dezembro de 2012. Teve sua aprovação junto à Comissão Científica do Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde (ANEXO 1), pelos Comitês de Ética em Pesquisa da PUCRS e da Santa Casa de Porto Alegre, conforme parecer consubstanciado (ANEXO 2).

Em relação a riscos e benefícios, podemos afirmar que não há risco adicional para as pacientes visto que o material coletado faz parte do procedimento cirúrgico ao qual a paciente será submetida. Os benefícios poderão ser em longo prazo, após obtenção dos resultados do trabalho, que poderão ser úteis para melhor elucidação da doença e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

5.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

5.2.1 Local de realização do estudo

O estudo experimental foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

5.2.2 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo transversal, com amostras oriundas de pacientes submetidas a cirurgias realizadas no período de março de 2013 a maio 2014.

5.3 PACIENTES E AMOSTRA

Pacientes dos ambulatórios de reprodução humana do Serviço de Ginecologia do HSL-PUCRS e do ambulatório de ginecologia endocrinológica do Serviço de Ginecologia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre com suspeita de endometriose, e indicação cirúrgica para tratamento e ou diagnóstico da doença, foram convidadas a participar do estudo no momento em que compareceram ao ambulatório para consulta pré-operatória. Após longa explanação sobre os objetivos do estudo, benefícios e malefícios da participação, as pacientes que aceitaram participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 3). Neste momento, foi empregado um questionário com perguntas básicas de cunho demográfico e de saúde, com o intuito de definir as características das pacientes e caracterizar a fase do ciclo menstrual em que se encontravam e os antecedentes mórbidos (ANEXO 4). A partir deste questionário, as pacientes foram identificadas por meio de um número previamente designado e esta foi a única forma de identificação que qualquer colaborador desta pesquisa teve acesso.

Os procedimentos foram realizados por um dos médicos ginecologistas do Serviço de Ginecologia do Hospital São Lucas da PUCRS, no bloco cirúrgico do Hospital São Lucas da PUCRS ou por um dos médicos ginecologistas do Serviço de Ginecologia da Santa Casa de Porto Alegre, no bloco cirúrgico do Hospital Santa Clara no Complexo Hospitalar Santa Casa.

5.3.1 Obtenção das biópsias endometriais e do tecido endometrial ectópico

As biópsias endometriais foram coletadas durante a realização de vídeo-histeroscopia com visualização direta da cavidade. A paciente, após anestesia, foi colocada em posição de litotomia, e, após a avaliação da cavidade endometrial (procedimento de rotina), foi coletada amostra de endométrio (procedimento também de rotina para avaliação do tecido endometrial) com a utilização de um cateter de Pipelle® (CCD International, Paris, França). Cada amostra coletada foi identificada com o número designado à paciente e dividida em duas porções, uma armazenada em formol e imediatamente enviada para o setor de patologia da instituição para análise e confirmação histológica da fase do ciclo menstrual em que a paciente se encontrava; a outra foi colocada em um tubo contendo um volume 5 vezes o tamanho da amostra da solução de RNAlater® (Ambion, Califórnia, EUA) e armazenada por 24 horas na temperatura de 4°C, e, após este período, a amostra foi transferida para um freezer a -80°C, em que permaneceu até o momento da análise.

Para a coleta do tecido ectópico após iniciado procedimento de laparoscopia e, após a realização do pneumoperitônio e visualização direta das lesões, foi realizada excisão completa da lesão de endometriose. O tecido foi dividido em dois e parte enviado para a patologia para confirmação histopatológica de endometriose e o restante armazenado, como o tecido endometrial tópico.

5.3.2 Critérios de Inclusão

Todas as pacientes oriundas do Serviço de Ginecologia do HSL-PUC e do Serviço de Ginecologia da Santa Casa de Porto Alegre, submetidas a cirurgia no período determinado, que aceitaram participar do estudo assinando TCLE.

5.3.3 Critérios de Exclusão

Pacientes em uso de medicamento hormonal esteróides nos últimos 3 meses.

Pacientes em uso de medicamento para tratamento de doenças crônicas.

Pacientes portadoras de doenças crônicas (como HAS e Diabetes Mellitus).

Pacientes que não tenham o diagnóstico de endometriose confirmado histologicamente.

Pacientes com achados inesperados durante a videolaparoscopia, como massas pélvicas e suspeita de DIP ou com suspeita de adenomiose.

Pacientes com patologia intraendometrial (exemplo: pólipos e mioma).

Pacientes que não sabiam informar a data da última menstruação ou com sangramento uterino anormal.

Pacientes com idade menor que 18 anos ou maior que 40 anos no momento da cirurgia.

5.4 EXPRESSÃO DOS miRNA135a e 135b POR PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

Inicialmente, o tecido armazenado a -80°C foi descongelado e cortado com auxílio de lâminas de bisturi em diminutas porções utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, Califórnia, EUA). A extração de RNA foi realizada de acordo com as orientações do fabricante. As concentrações das amostras de RNA foram determinadas por meio de plataforma fluorimétrica (QuBit® 2.0 Fluorometer, Invitrogen, Califórnia, EUA) a partir da diluição seriada de padrões de referência.

Os oligonucleotídeos iniciadores para miR135a, miR135b e U6 foram obtidos do laboratório Invitrogen (Califórnia, USA), e tinham as sequências de oligonucleotídeos conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Sequência nucleotídica dos oligonucleotídeos iniciadores

miRNA	Sequência
miR135a	5'-TATGGCTTTTTATTCCTATGTGA-3'
miR135b	5'-TATGGCTTTTCATTCCTATGTGA-3'
U6 forward	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
U6 reverse	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

Para a detecção do miRNA, foi empregado o método poly (A) RT-PCR utilizando o kit NCode miRNA first-strand cDNA synthesis MIRC-50 kit (Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Os genes foram amplificados por meio da técnica da PCR em tempo real utilizando o aparelho AB 7500 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), com iniciadores específicos para cada miRNA e um iniciador universal reverso complementar. Iniciadores específicos para U6, um pequeno RNA nuclear não codificado que possui uma sequência mais conservadora entre os spliceossomas de todas as espécies, foram utilizados como controle para determinar a expressão relativa do miRNA.

A PCR em tempo real foi realizada utilizando um “Master Mix” para PCR em tempo real da Quatro G (Porto Alegre, Brasil). Inicialmente, o cDNA foi diluído (1:10), e 5µL foram utilizados para uma reação total de 50 µL (de acordo com orientações do fabricante). A reação foi composta por cDNA, oligonucleotídeo iniciador específico e universal para os microRNAs, e oligonucleotídeo iniciador *forward* e *reverse* para U6 *primer* para o U6, água livre de RNase e master mix para PCR. Cada reação foi realizada em duplicata.

Os períodos e as temperaturas utilizados no termociclador foram: ativação inicial do UDG a 50°C por 2 minutos, seguidos de uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos. A seguir, foram realizados 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e anelamento a 57°C por 20 segundos. Para análise de *melting*, foi empregada uma temperatura de 74 a 99°C com uma taxa de elevação de 0,2°C/segundo. Os dados do ciclo *threshold* (Ct) e as curvas *melting* foram adquiridos por meio do programa AB 7500 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) iCycler iQ system (Bio-Rad Laboratories).

Os dados da expressão relativa dos níveis dos miRNAs foram analisados e apresentados empregando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, também conhecida como método Livak (127).

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio dos testes não paramétricos de Willcoxon e Mann Whitney, utilizando o programa SPSS, versão 20.0, e considerando significativo um $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

Foram coletadas amostras de 31 pacientes que preenchiem os critérios de inclusão do estudo. Após a realização dos primeiros experimentos, oito pacientes foram excluídas pois as concentrações de mRNA obtidas foram muito baixas. Desta forma, vinte e três pacientes tiveram seus dados analisados. A idade média foi 32 anos, variando entre 24 e 40 anos. Dezesesseis pacientes eram nulíparas e 7 já haviam engravidado pelo menos uma vez. Uma paciente apresentava suspeita de endometriose há 10 anos, duas, há 3 anos, outras duas, há 2 anos, quatro, há um ano, três, há alguns meses, e, em 11 pacientes, submetidas a cirurgia por infertilidade, até então sem causa aparente, e que não apresentavam sintomatologia dolorosa como suspeição de endometriose, tiveram o diagnóstico no momento da cirurgia. O principal sintoma que levou as pacientes a serem submetidas ao procedimento cirúrgico foi dor pélvica (30%), infertilidade (57%) e ambos (13%). Estes dados podem ser visualizados na Tabela 3. As pacientes apresentavam endometriose classificada como leve a moderada, estágios II e III, de acordo com a classificação revisada pela Associação Americana de Medicina Reprodutiva em 1997 (128) (ANEXO 5).

Tabela 3 – Características da amostra

	Proliferativa (n=11)	Secretora (n=12)
Idade média (anos)	32,7	32,2
Tempo de suspeita		
10 anos	1	0
3 anos	1	1
2 anos	2	0
1 ano	3	1
Meses	2	1
Achado na VLPC	2	9
Paridade		
G0	7	4
G1 ou >	4	8
Sintoma que levou a cirurgia		
Dor	4	3
Infertilidade	5	8
Ambos	2	1

O local das lesões coletadas, em todas as pacientes, classificava a endometriose como superficial (peritônio, fossa ovárica e superfície uterina). Algumas pacientes apresentavam lesões profundas, endometrioma e comprometimento importante intestinal ou vesical, no entanto, devido à sintomatologia dolorosa, vinham em uso de medicamento hormonal e não foram incluídas no estudo (dados não analisados).

As 23 pacientes analisadas foram, inicialmente, avaliadas de forma global e, depois, separadas em diferentes fases do ciclo menstrual. Todas as pacientes apresentavam ciclos menstruais regulares. Onze pacientes encontravam-se na fase proliferativa do ciclo menstrual e 12 pacientes na fase secretora. Este critério foi definido de acordo com o método de Noyes (129).

6.1 EXPRESSÃO DO MICRORNA135A E 135B NAS LESÕES DE ENDOMETRIOSE E NO ENDOMÉTRIO TÓPICO

Todas as 23 amostras analisadas apresentaram expressão significativa de ambos miRNAs, tanto na lesão quanto no endométrio tópico. A expressão variou entre as pacientes de forma assimétrica.

6.2 EXPRESSÃO DO MICRORNA 135a NAS LESÕES DE ENDOMETRIOSE

Na análise inicial, comparando a expressão do microRNA135a nas lesões de endometriose com o endométrio destas pacientes, considerando todas as fases do ciclo menstrual, foi visto que, nas lesões de endometriose, este miR está 0,37 vezes mais expresso do que no endométrio ($p=0,98$). Mostrando, assim, que, entre estes dois tecidos, não foi evidenciada diferença significativa na expressão. Os dados são apresentados na Figura 4.

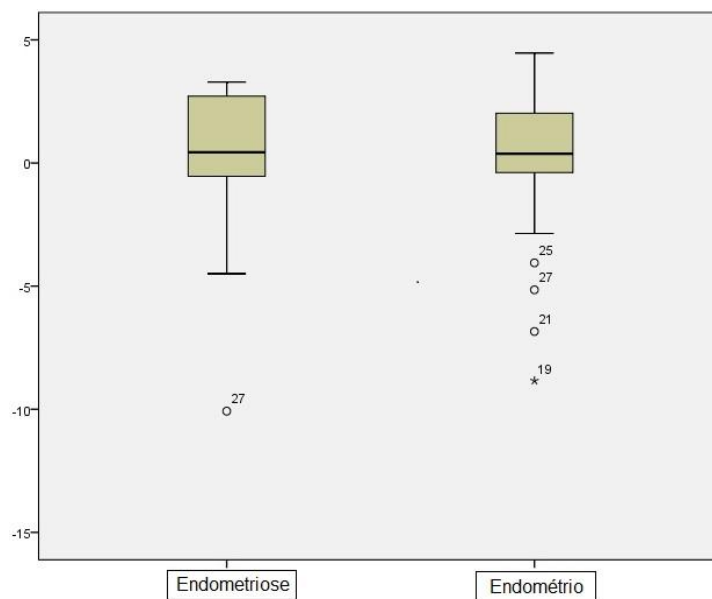


Figura 4 - Expressão do miRNA135a nas lesões de endometriose em comparação com o endométrio típico, análise global das 23 pacientes, utilizando o teste de Mann Whitney ($p=0,98$).

6.3 EXPRESSÃO DO microRNA135b NAS LESÕES DE ENDOMETRIOSE

Ao analisar a expressão do microRNA135b nas lesões de endometriose e no endométrio das pacientes estudadas, considerando ambas fases do ciclo menstrual, foi constatada uma expressão de 1,82 maior na lesão de endometriose em comparação ao endométrio típico, no entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,80$), dados apresentados na Figura 5.

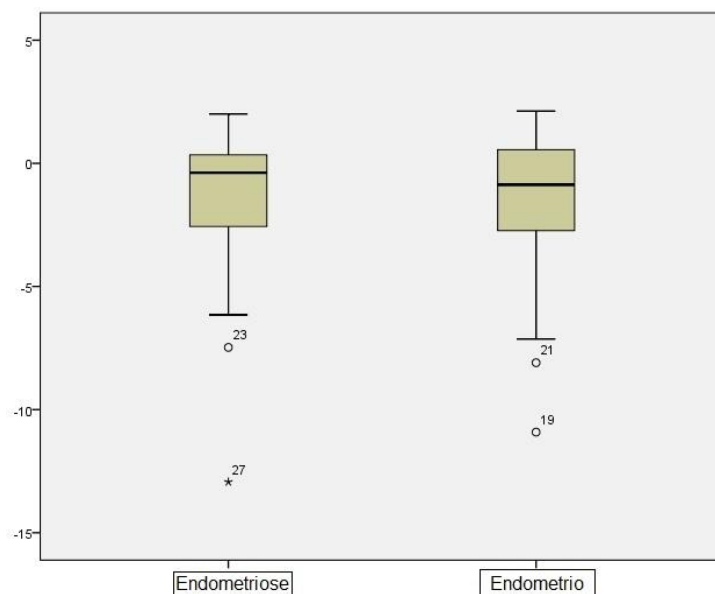


Figura 5 - Expressão do miRNA135b nas lesões de endometriose em comparação com o endométrio tópico, análise global das 23 pacientes, utilizando o teste de Mann Whitney ($p=0,80$).

6.4 EXPRESSÃO DO microRNA135a NAS DIFERENTES FASES DO CICLO MENSTRUAL

As pacientes foram separadas nas duas fases do ciclo menstrual, proliferativa e secretora.

Na fase proliferativa e na fase secretora do ciclo não foi detectada diferença na expressão do microRNA nas lesões de endometriose em comparação com o endométrio tópico, analisando as fases isoladamente. No entanto, na fase secretora, o miRNA135a diminuiu sua expressão em 3,7 vezes quando comparada à expressão da fase proliferativa do ciclo ($p=0,01$) (Figura 6), evidenciando que, na segunda fase do ciclo, há uma diminuição da expressão deste microRNA nas lesões de endometriose, quando comparada com o endométrio tópico em relação ao início do ciclo menstrual.

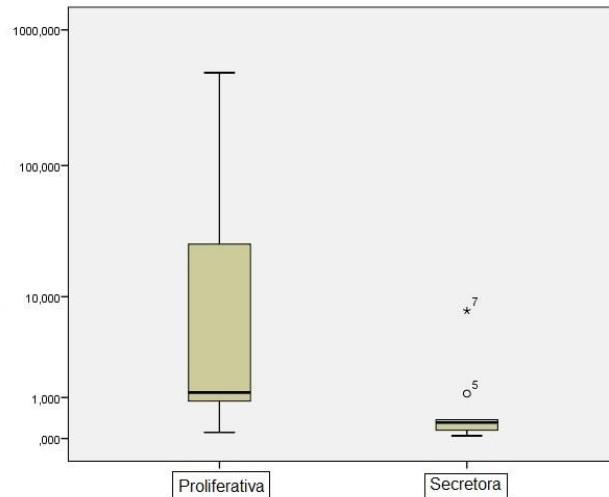


Figura 6 - Expressão do miRNA135a nas diferentes fases do ciclo menstrual comparando o endométrio ectópico com o endométrio tópico, evidenciando uma menor expressão na fase secretora do ciclo menstrual. Análise estatística utilizando o teste de Mann Whitney ($p=0,01$).

6.5 EXPRESSÃO DO microRNA135b NAS DIFERENTES FASES DO CICLO MENSTRUAL

Ao analisar a expressão do mir135b separando as pacientes nas diferentes fases do ciclo, não foi observada diferença significativa na expressão do miRNA tanto na fase proliferativa quanto na fase secretora. No entanto, ao comparar a expressão deste microRNA na fase proliferativa com a fase secretora, foi evidenciado que, na fase secretora, o miR135b está 4,75 vezes menos expresso no endométrio ectópico quando comparado com a fase proliferativa ($p=0,032$) (Figura 7).

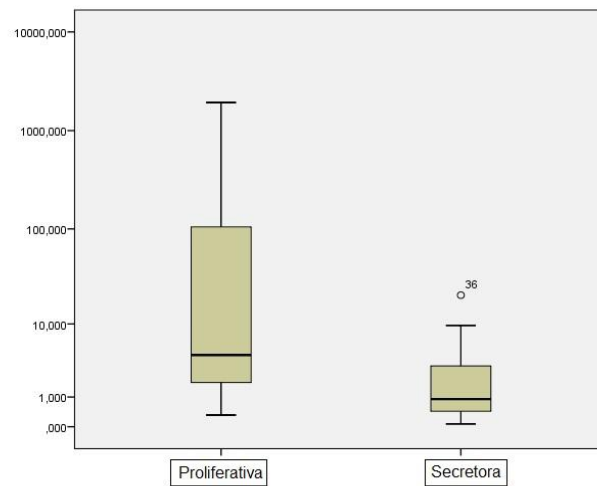


Figura 7 - Expressão do miRNA135b nas diferentes fases do ciclo menstrual comparando o endométrio ectópico com o endométrio tópico, evidenciando uma menor expressão na fase secretora do ciclo menstrual. Análise estatística utilizando o teste de Mann Whitney ($p=0,03$).

7. DISCUSSÃO

O gene HOXA10 tem sido intensamente estudado e implicado na fisiopatologia da endometriose. A escolha do microRNA135a e 135b como objeto deste estudo se deve à importante regulação que estes miRNAs exercem sobre o HOXA10 e à falta de informações sobre o comportamento desses miRNAs nesta doença.

A endometriose, utilizando a simples definição de que são células endometriais que se localizam fora da cavidade uterina, é uma doença sabidamente responsiva ao estímulo hormonal. Alguns estudos mostram que estas células ectópicas são resistentes à progesterona, mas, possivelmente, isso se deva à ausência de um efeito anti-estrogênico no tecido endometriótico (130). Diferentes perfis de miRNAs têm sido descritos em diferentes tecidos endometrióticos (endometriomas, endometriose peritoneal, endometriose ovariana, entre outros) e comparados com a expressão de miRNAs no endométrio eutópico das mesmas pacientes. Estas lesões de endometriose também têm sido descritas e pesquisadas em diferentes fases do ciclo menstrual. Alguns estudos comparam amostras de pacientes com diferentes estágios da doença e tentam identificar a importância dos miRNAs na classificação das lesões de endometriose (17, 131).

Todos os estudos já publicados levantam hipóteses e diferentes caminhos para comprovar a importância dos miRNAs no desenvolvimento e na manutenção das lesões de endometriose (Tabela 1).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão de dois microRNAs, 135a e 135b (miR135), nas lesões de endometriose em comparação com o endométrio tópico em diferentes fases do ciclo menstrual.

A expressão do miR135 está aumentada no endométrio tópico de pacientes com endometriose em comparação com o endométrio de pacientes sem a doença e já foi descrito que esta alteração tem relação direta com a expressão do HOXA10, um gene reconhecidamente relacionado com a implantação embrionária, e com expressão diminuída no endométrio tópico e nas lesões de endometriose em comparação com pacientes livres da doença (9,20).

Os estudos envolvendo miRNAs e endometriose têm aumentado significativamente na literatura médica nos últimos anos. Vários autores buscam identificar aqueles miRNAs mais prevalentes por meio da análise por microarranjo tecidual e relacioná-los com genes envolvidos na patogênese da endometriose. Dentre todas as publicações revisadas, especialmente aquelas que utilizaram programas para identificar miRNAs relacionados à endometriose, apenas um estudo publicado anteriormente analisou a expressão do miR135 (20).

A maior parte dos estudos busca identificar diferença na expressão de miRNAs, principalmente, em relação a pacientes normais, comparando o endométrio típico de pacientes com endometriose com pacientes livres da doença. Poucos investigadores avaliaram a expressão na lesão em relação ao endométrio típico na mesma paciente. Além disso, muitas publicações consideram a expressão dos miRNAs somente no endométrio típico e em determinada fase do ciclo menstrual (geralmente a fase secretora). Após longa revisão, este parece ser o primeiro estudo que investiga a expressão do miR135 em pacientes com endometriose comparando lesão e tecido endometrial típico na mesma paciente e avaliando seu padrão de expressão nas fases do ciclo menstrual.

Acredita-se que o tecido endometriótico seja mais suscetível a flutuações hormonais do que o endométrio típico, sendo assim, a lesão sofreria mais alterações em relação a oscilações de estradiol e progesterona do que o endométrio das pacientes com endometriose. Ohlsson Teague avaliou a expressão de miRNA em diferentes fases do ciclo menstrual e não constatou diferença na expressão destes miRNAs comparando a fase proliferativa com a secretora em pacientes com endometriose (118). No presente estudo, pode-se constatar que o miR135 teve uma expressão diminuída na segunda fase do ciclo, em que há, sabidamente, níveis de estradiol mais baixos e níveis de progesterona mais altos, o que vai de acordo com a literatura de que as lesões de endometriose são hormônios dependentes e nutridas por altos níveis de estradiol. É possível enfatizar que, conforme descrição de Zanatta (132), o HOXA10 sofre influência direta de progesterona o que justificaria os altos níveis deste gene na fase secretora média em pacientes sem endometriose. Ao constatar que o miR135 está diminuído nesta fase em comparação com a fase proliferativa, podemos pressupor que teríamos aqui níveis mais altos da expressão do HOXA10 do que na fase proliferativa, o que

reforça a importância desta relação miRNA-mRNA. No entanto, assim sendo, é fundamental realizar novos estudos comparando esta relação em pacientes com endometriose com pacientes livres da doença e confirmar se as pacientes com endometriose terão níveis mais baixos em relação às pacientes controle e assim corroborar com os achados que comprovam a relação do HOXA10 com a falha de implantação nas pacientes com endometriose.

Lin avaliou a expressão do microRNA20a no endométrio tópico em comparação com o endométrio ectópico e encontrou uma expressão maior no tecido ectópico. Relacionou esta alteração ao controle da proteína DUSP2 que tem importante função na angiogênese e proliferação de células estromais endometriais (133). No entanto, estes achados vão contra publicações anteriores (134), mas os autores deixam claro que a utilização de tecido total de endométrio (epitélio e estroma), e o uso de células purificadas e específicas leva a proporções diferentes de tecido e pode resultar em alterações nos resultados quantitativos. No presente estudo, foi avaliado o tecido endometrial como um todo, sem separar epitélio e estroma. Outros estudos já publicados mostram diferença na expressão de determinados microRNAs ao avaliar somente determinada porção do tecido endometrial (105,118).

Um grande estudo que verificou a diferença de diversos miRNAs na mesma paciente (endométrio e lesão de endometriose) avaliou, ainda, a expressão no endométrio de pacientes sem doença e no endométrio de pacientes com endometriose mas sem lesão de endometriose correspondente. Este estudo avaliou o tecido separando epitélio e estroma, e todos na fase secretora do ciclo menstrual. Constatou que há 48 microRNAs com expressão alterada nesta comparação e diversos dos microRNAs descritos estão envolvidos no estabelecimento e na progressão da endometriose em processos como angiogênese, inflamação e regulação do sistema imune, no entanto o miR135 não está entre os microRNAs identificados (105).

Dois estudos encontrados na literatura (17,118) com a metodologia semelhante à utilizada no presente trabalho identificaram, por meio de microarranjo tecidual, a expressão de miRNAs que se mostravam alterados na comparação de endométrio tópico com endométrio ectópico (em um deles, foi analisada somente endometriose ovariana). Os autores descrevem os microRNAs que estariam, pelo

menos, 1,5 vezes mais expressos (no estudo de Filigheddu, foi considerada uma expressão maior que duas vezes) na endometriose do que no endométrio, dos 50 microRNAs listados por Filigheddu e dos 22 identificados por Ohlsson Teague. Estes resultados não apresentam o miR135 entre os achados confirmando o que aqui é apresentado de que não há diferença na expressão deste marcador na lesão de endometriose em relação ao endométrio das pacientes com a doença.

Estudo publicado por Shi (135) identificou diferentes miRNAs no endométrio normal, tópico e ectópico de pacientes com endometriose, incluindo o miR183 que, ao ter sua expressão diminuída, aumenta o potencial de invasão e inibe a apoptose de células endometriais estromais. Também foi constatado que a expressão do miR183 pode ser inibida pelo estímulo de esteroides ovarianos e fatores inflamatórios. Estes achados sugerem que a alteração na expressão do miR183 está envolvida no desenvolvimento e na progressão da endometriose como parte de mecanismos epigenéticos. No presente estudo, não foi testada, diretamente, a alteração na expressão do miR135 com diferentes níveis de estradiol, mas foi possível constatar que, na fase secretora do ciclo, em que os níveis de estrogênio estão diminuídos, houve uma diminuição na expressão deste miR tanto no endométrio ectópico como no tópico, sugerindo que este hormônio exerça um efeito direto na expressão e, conseqüentemente, na regulação dos genes por ele controlados.

Um interessante estudo comparou a diferença de miRNAs no endométrio tópico de pacientes com endometriose em diferentes graus da doença (leve e moderada), sugerindo que o estágio da doença tem relação com sinalizações celulares diferentes reguladas por diferentes microRNAs, no entanto, não temos informação sobre estas alterações no endométrio ectópico destas pacientes (131). Na amostra analisada no presente estudo, foram evidenciados diferentes graus de endometriose, mas estas pacientes foram analisadas independente da severidade da doença.

Uma extensa revisão realizada por Hull (136) constatou que é difícil determinar a origem celular da endometriose associada a miRNAs, mas a demonstração da expressão de diferentes microRNAs no endométrio tópico e ectópico pode confirmar, de forma experimental, a relação de alguns miRNA-mRNA com endometriose, o que poderia levar à busca de métodos diagnósticos ou

terapêuticos por meio da manipulação destes miRNA que iriam alterar a expressão dos seus mRNAs alvos.

Santamaria realizou uma extensa revisão da literatura buscando o que já foi pesquisado em relação a miRNAs e doenças ginecológicas hormônio dependentes. Ele refere que há 6 microRNAs que tem um potencial de serem ferramentas diagnósticas importantes. Entre eles, estão o miR199a e o miR542-3p que, quando usados em conjunto, atingem uma sensibilidade e especificidade de 96,61% e 76,66% respectivamente. Além disso, o miR199a está relacionado a aderências pélvicas e à distribuição das lesões, e está envolvido nas sinalizações celulares mediadas por hormônio, demonstrando um papel importante na progressão da doença. Nesta publicação, mais uma vez, os achados sustentam o fato de que miRNAs circulantes poderão ser usados como importantes biomarcadores não invasivos para diagnosticar e classificar casos de endometriose, e, até mesmo, para diferenciar endometriose leve de severa (137).

Dados ainda não publicados, mas apresentados em evento científico por Cho, buscou identificar a expressão do miR135 no sangue de pacientes submetidas à cirurgia e que tiveram o diagnóstico de endometriose confirmado histologicamente. Esta expressão foi comparada com o sangue de pacientes sem o diagnóstico da doença. Foi visto que o miR135a está menos expresso no sangue de pacientes com endometriose do que nas pacientes controle, com uma sensibilidade e especificidade de 66,7 e 87,5% respectivamente (138).

Sendo assim, a importância da identificação do miR135 em lesões de endometriose e a confirmação do seu envolvimento na patogênese da doença mostra uma linha promissora de pesquisa frente à identificação prévia da presença deste microRNA em sangue de pacientes com a doença, podendo ser uma importante ferramenta diagnóstica e uma arma para o desenvolvimento terapêutico.

Ainda dentro do espectro da diferença dos resultados encontrados na literatura, Gilabert-Estellés (139) publicou uma revisão do papel dos microRNAs nas patologias ginecológicas hormônios dependentes. Ele refere que três trabalhos independentes (17,118,134), demonstram que o miR17-5p e miR20a, envolvidos na regulação da angiogênese, estão diminuídos no endometrioma ovariano em comparação com o endométrio. Em contraste, duas outras publicações mostram resultados opostos em relação à expressão destes microRNAs. O autor sugere que

esta diferença nas publicações seja devido ao pequeno número de amostras em alguns estudos, e diferenças cruciais no desenho do estudo e nos métodos de análise.

Cabe, aqui, salientar a importância da análise realizada comparando o tecido ectópico com o tópico pareado da mesma paciente, pois, independente do número de amostras e da metodologia de análise, existem diversos fatores de confusão entre as pacientes que podem, facilmente, alterar os resultados. Desta forma, as pacientes, neste trabalho, foram analisadas, inicialmente, individualmente, na tentativa de diminuir os vieses de seleção.

Estudo publicado por Ramon *et al* (134) analisou diversos microRNAs em distintas lesões de endometriose e verificou que diferentes lesões expressam microRNAs diferentemente. Este achado está em acordo com o encontrado no presente estudo de que o miR135 está expresso em todas as lesões de endometriose, porém de forma muito assimétrica, possivelmente devido a fatores expressos por cada paciente, pela localização da lesão, severidade da doença e, até mesmo, pela sintomatologia apresentada. Mais estudos serão necessários para elucidar esses achados.

Talvez o mais interessante que possa ser ressaltado dentre todos estes estudos publicados é a diversidade de resultados que existem quando o mesmo miRNA é analisado por diferentes autores.

Desta forma, fica claro que a ação de diversos microRNAs relacionados à patogênese da endometriose tem sido estabelecida e comprovada, o que ainda não está claro é qual a exata contribuição de cada um destes microRNAs na formação e manutenção da doença. Em relação ao miR135, cada vez mais encontramos dados que ressaltam a sua importância na fisiopatologia da endometriose e sua relação com genes sabidamente envolvidos na falha de implantação que ocorre nestas pacientes, no entanto é fundamental manter as investigações para elucidar melhor este envolvimento.

8. CONCLUSÃO

Após a análise de 23 pacientes, pode-se concluir que:

- O microRNA 135a e 135b (miR135) está expresso no endométrio ectópico e no endométrio tópico.
 - A expressão do miR135 no endométrio ectópico se apresenta de forma assimétrica
 - A expressão do miR135 no endométrio tópico também se apresenta de forma assimétrica.
 - Comparando a expressão do miR135 no endométrio ectópico com o endométrio tópico não se constatou diferença significativa.
 - A comparação da expressão do miR135 no endométrio ectópico com o endométrio tópico nas diferentes fases do ciclo menstrual constatou uma menor expressão destes microRNAs na fase secretora do ciclo.
-

9. PERSPECTIVAS

MicroRNAs, ao se ligarem à região 3' do seu gene-alvo, induz uma repressão translacional ou ativação da programação intracelular do seu mRNA alvo. Aumento ou diminuição na expressão destes microRNAs determinarão a expressão de forma desregulada de diversos mRNAs alvos.

Diversos estudos demonstram que os miRNAs têm um papel fundamental na regulação de processos biológicos, incluindo progressão celular, proliferação, diferenciação, angiogênese e apoptose. Os miRNAs também têm sido implicados na patogênese de diversas patologias benignas e malignas, incluindo patologias do trato reprodutivo.

Há um aumento nas evidências de que a fisiopatologia da endometriose tem uma predisposição genética e/ ou ambiental. Há gama de estudos envolvendo miRNAs que comprovam sua expressão alterada nas pacientes com endometriose. Estes estudos demonstram a relação com genes ou vias celulares sabidamente relacionadas a fatores fisiológicos envolvidos no desenvolvimento ou manutenção das lesões de endometriose e aumentam ou, até, comprovam as suspeitas de que os miRNAs estão envolvidos neste processo.

Ao constatar que mir135 tem uma expressão alterada durante o ciclo menstrual, comprovando uma expressão dinâmica, podemos supor que eles tenham um papel fundamental na regulação desta homeostase. Assim sendo, alterações na expressão de miRNAs podem prejudicar o funcionamento endometrial, tendo um impacto negativo na implantação embrionária.

Embora mais estudos sejam necessários para elucidar o papel do mir135 na endometriose, este microRNA, tem se tornado, sem dúvida, um importante utensílio na compreensão e elucidação desta doença, e se tornado um candidato a biomarcador para guiar intervenções terapêuticas.

É possível que a manipulação de níveis de miRNA com visão terapêutica possa modificar os resultados insatisfatórios que a alteração nestas expressões

podem causar ao alterar a expressão do genes por eles regulados, mas, para isso, mais estudos são necessários.

10. REFERÊNCIAS

1. C Von Rokitsansky. Ueber uterusdrusen-neubildung in uterus and ovarilsarcomen. *Z Ges Aerzte Wein*, 1860; 37: 577-93.
 2. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*, 2004 Nov 13-19; 364(9447):1789-99.
 3. Snesky TE, Liu DT. Endometriosis: associations with menorrhagia, infertility, and oral contraceptives. *Int J Gynaecol Obstet*, 1980 May-Jun; 17(6): 573-6.
 4. Houston DE. Evidence for the risk of pelvic endometriosis by age, race, and socioeconomic status. *Epidemiol Rev*, 1984; 6: 167-91.
 5. Cramer DW. Epidemiology of endometriosis in adolescents. In: Wilson EA, ed. *Endometriosis*. New York: Alan Liss, 1987: 5-8.
 6. Taylor HS, Vanden Heuvel GB, Igarashi P. A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod*, 1997 Dec; 57(6):1338-45.
 7. Cermik D, Karaca M, Taylor HS. HOXA10 expression is repressed by progesterone in the myometrium: differential tissue-specific regulation of HOX gene expression in the reproductive tract. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001 Jul; 86(7):3387-92.
 8. Zanatta A, Rocha AM, Carvalho FM et al. The role of the Hoxa10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis and its related infertility: a review. *J Assist Reprod Genet*, 2010 Dec; 27(12):701-10.
 9. Taylor HS, Bagot C, Kardana A et al. HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod*, 1999 May; 14(5):1328-31.
 10. Taylor HS, Arici A, Olive D, et al. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest*, 1998 Apr; 101(7):1379-84.
 11. McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell*, 1992 Jan; 68(2):283-302.
 12. Browne H, Taylor H. HOXA10 expression in ectopic endometrial tissue. *Fertil Steril*, 2006 May; 85(5):1386-90.
 13. Bartel, DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, 2009 Jan; 136(2): 215-33.
-

14. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*, 2008 Jan; 358(5):502-11.
 15. Nothnick WB. The role of micro-RNAs in the female reproductive tract. *Reproduction*, 2012 May;143(5):559-76.
 16. Ohlsson-Teague EM, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update*, 2010 Mar-Apr;16(2):142-65.
 17. Filigheddu N, Gregnanin I, Porporato PE, et al. Differential Expression of MicroRNAs between Eutopic and Ectopic Endometrium in Ovarian Endometriosis. *J Biomed Biotechnol*, 2010;2010:369549.
 18. Wu Y, Kajdacsy-Balla A, Strawn E, et al. Transcriptional characterizations of differences between eutopic and ectopic endometrium. *Endocrinology*, 2006 Jan; 147 (1): 232-46.
 19. Eyster KM, Klinkova O, Kennedy V, et al. Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrium. *Fertil Steril*, 2007 Dec; 88(6): 1505-33.
 20. Petracco R, Grechukhina O, Popkhadze S, et al. MicroRNA 135 regulates HOXA10 expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011 Dec;96(12):E1925-33.
 21. Petracco RG, Kong A, Grechukhina O, et al. Global Gene Expression Profiling of Proliferative Phase Endometrium Reveals Distinct Functional Subdivisions. *Reprod Sci*, 2012 Oct;19(10):1138-45.
 22. Sanfilippo JS, Williams RS, Yussman MA et al. Substance P in peritoneal fluid. *Am J Obstet Gynecol*, 1992 Jan; 166(1 Pt 1):155-9.
 23. R Hadfield, H Mardon, D Barlow et al. Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. *Hum Reprod*, 1996; Apr; 11(4): 878-80.
 24. Simoens S, Dunselman G, Dirksen C et al. The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Hum Reprod*, 2012 May; 27(5):1292-9.
 25. CramerDW, Wilson E, Stillman RJ et al. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. *JAMA*, 1986 Apr; 255(14):1904-8.
 26. Arumugam K, Lim JM. Menstrual characteristics associated with endometriosis. *Br J Obstet Gynaecol*, 1997 Aug; 104(8):948-50.
 27. VercelliniP, De Giorgi O, Aimi G et al. Menstrual characteristics in women with and without endometriosis. *Obstet Gynecol*, 1997 Aug; 90(2):264-8.
-

28. Cramer DW, Missmer SA. The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*, 2002 Mar; 955:11-22.
 29. Moen MH, Magnus P. The familial risk of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1993 Oct; 72(7): 560-4.
 30. Blumenfeld Z. Hormonal suppressive therapy for endometriosis may not improve patient health. *Fertil Steril*, 2004 Mar; 81(3):487-92.
 31. Van Gorp T, Amant F, Neven P, et al. Endometriosis and the development of malignant tumours of the pelvis: a review of the literature. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2004 Apr;18(2): 349-71.
 32. Vericellini P, Parazzini F, Bolis G et al. Endometriosis and ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 1993 Jul; 169(1):181-2.
 33. Weiss HA, Brinton LA, Potischman NA et al. Breast cancer risk in young women and history of selected medical conditions. *Int J Epidemiol*, 1999 Oct; 28(5): 816-23.
 34. Wyshak G, Frisch RE, Albright NL et al. Reproductive factors and melanoma of the skin among women. *Int J Dermatol*, 1989 Oct; 28(8); 527-30.
 35. Hornstein MD, Thomas PP, Sober AJ et al. Association between endometriosis, dysplastic naevi and history of melanoma in women of reproductive age. *Hum Reprod*, 1997 Jan; 12(1): 143-5.
 36. Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM et al. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril*, 1990 Jun; 53(6):978-83.
 37. Barlow DH, Glynn CJ. Endometriosis and pelvic pain. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, 1993 Dec;7(4):775-89. Review.
 38. Bazot M, Lafont C, Rouzier R et al. Diagnostic accuracy of physical examination, transvaginal sonography, rectal endoscopic sonography, and magnetic resonance imaging to diagnose deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril*, 2009 Dec;92(6):1825-33.
 39. Hudelist G, Ballard K, English J et al. Transvaginal sonography vs. clinical examination in the preoperative diagnosis of deep infiltrating endometriosis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2011 Apr;37(4):480-7
 40. Bazot M, Daraï E.J. Sonography and MR imaging for the assessment of deep pelvic endometriosis. *Minim Invasive Gynecol*, 2005 Mar-Apr; 12(2):178-85; quiz 177, 186.
 41. Abrão MS, Podgaec S, Pinotti JA, de Oliveira RM. Tumor markers in endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet*, 1999 Jul; 66(1): 19-22.
-

42. Lee B, Du H, Taylor HS. Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium. *Biol Reprod*, 2009 Jan; 80(1):79-85.
 43. Du H, Taylor HS. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells*, 2007 Aug; 25(8):2082-6.
 44. Hadfield RM, Mardon HJM, Barlow D.H et al. Endometriosis in monozygotic twins. *Fertil Steril*, 1997 Nov; 68(5): 941-2.
 45. Kennedy S, Mardon H, Barlow D. Familial Endometriosis. *J Assist Reprod Genet*, 1999 Oct; 12(1): 32-4.
 46. Sampson J. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*, 1927; 14:422-69.
 47. Ramey JW, Archer DF. Peritoneal fluid: its relevance to the development of endometriosis. *Fertil Steril*, 1993 Jul; 60(1): 1-14.
 48. Kruitwagen RFPM, Poels LG, Willemsen WNP et al. Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertil Steril*, 1991 Feb; 55(2):297-303.
 49. Blumenkrantz MJ, Gallagher N, Bashore RA et al. Retrograde menstruation in women undergoing chronic peritoneal dialysis. *Obstet Gynecol*, 1981 May; 57(5): 667-70.
 50. Jenkins S, Olive DL, Haney AG. Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol*, 1986 Mar; 67(3): 355-8.
 51. Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med*, 2009 Jan; 360(3):268-79.
 52. Halme J, Hammond MG, Hulka JF et al. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol.*, 1984 Aug; 64(2):151-4.
 53. Redwine DB. 'Invisible' microscopic endometriosis: a review. *Gynecol Obstet Invest*, 2003;55(2):63-7.
 54. Russo L, Woolmough E, Heatley MK. Structural and cell surface antigen expression in the rete ovarii and epoophoron differs from that in the fallopian tube and in endometriosis. *Histopathology*, 2000 Jul; 37(1): 64-9.
 55. Nap AW, Groothuis PG, Demir AY et al. Pathogenesis of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2004; Apr; 18(2): 233-44.
 56. Metzger DA, Haney AF. Etiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 1989 Mar;16(1):1-14.
 57. Levander G, Normann P. The pathogenesis of endometriosis: an experimental study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1955; 34(4): 366-98.
-

-
58. Merrill JA. Endometrial induction of endometriosis across milipore filters. *Am J Obstet Gynecol*, 1966; Mar; 94(6): 780-9.
 59. Von Recklinghausen F. Adenomyomas and cystadenomas of the wall of the uterus and tube: their origin as remnants of the wolffian body. *Wien Klin Wochenschr*, 1896;8:530.
 60. Russell WW. Aberrant portions of the mullerian duct found in an ovary: ovarian cysts of mullerian origin. *Bull John Hopkins Hospital*, 1899;10:8-10.
 61. Jubanyik KJ, Comite F. Extrapelvic endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 1997 Jun; 24(2):411-40.
 62. Fanton JW, Golden JG. Radiation-induced endometriosis in *Maccaca mulatta*. *Radiat Res*, 1991; May;126(2): 141-6.
 63. Koninckx PR, Braet P, Kennedy SH et al. Dioxin pollution and endometriosis in Belgium. *Hum Reprod*, 1994: Jun; 9(6):1001-2.
 64. Myers JP, Guillette LJ Jr, Palanza P et al. The emerging science of endocrine disruption. Science and Culture Series. International Seminar on Nuclear War and Planetary Emergencies. 28th Session, 2003, Erice, Italy.
 65. Georgiou I, Syrrou M, Bouba I et al. Association of estrogen receptor gene polymorphisms with endometriosis. *Fertil Steril*, 1999 Jul;72(1):164-6.
 66. Misao R, Sun WS, Iwagaki S et al. Identification of various exon-deleted progesterone receptor mRNAs in human endometrium and ovarian endometriosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998 Nov 18;252(2):302-6.
 67. Jiang X, Hitchcock A, Bryan EJ et al. Microsatellite analysis of endometriosis reveals loss of heterozygosity at candidate ovarian tumor suppressor gene loci. *Cancer Res*, 1996 Aug 1;56(15):3534-9.
 68. Kosugi Y, Elias S, Malinak LR et al. Increased heterogeneity of chromosome 17 aneuploidy in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 1999; Apr; 180(4): 792-7.
 69. Gogusev J, Bouquet de Joliniere J, Telvi L et al. Detection of DNA copy number changes in human endometriosis by comparative genomic hybridization. *Hum Genet*, 1999: Nov; 105(5); 444-51.
 70. Kennedy SH. Genetics of endometriosis: a review of the positional cloning approaches. *Sem Reprod Med*, 2003; May; 21(2): 111-8.
 71. Bischoff FZ, Simpson JL. Heritability and molecular genetic studies in endometriosis. *Hum Reprod Update*, 2000; Feb; 6(1): 37-44.
 72. Leibovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril*, 2001; Jan; 75(1): 1-10.
-

-
73. Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH. Endometriotic disease: the role of the peritoneal fluid. *Hum Reprod Update*, 1998; Sept-Oct; 4(5): 741-51.
 74. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, et al. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril*, 1991; Jul; 56(1): 45-51.
 75. Chegini N. Peritoneal molecular environment, adhesion formation, and clinical implication. *Front Biosci*, 2002; Apr; 1: e91-e115.
 76. Gazvani R, Templeton A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction*, 2002 Feb;123(2): 217-26.
 77. Bedaiwy MA, Falcone T. Peritoneal fluid environment in endometriosis: clinico pathological implications. *Minerva Ginecol*, 2004 Aug; 55(4): 333-45.
 78. Valle RF, Sciarra JJ. Endometriosis: Treatment Strategies. *Ann NY Acad Sci*, 2003 Nov; 997; 229-39.
 79. Fedele L, Bianchi S, Di Nola G et al. The recurrence of endometriosis. *Ann NY Acad Sci*, 1994 Sep 30;734:358-64. Review.
 80. Busacca M, Marana R, Caruana P et al. Recurrence of ovarian endometrioma after laparoscopic excision. *Am J Obstet Gynecol*, 1999 Mar; 180(3 Pt 1):519-23.
 81. Schindler AE, Foertig P, Kienle E et al. Early treatment of endometriosis with GnRH-agonists: impact on time to recurrence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2000 Dec; 93(2):123-5.
 82. Waller KG, Shaw RW .Gonadotropin-releasing hormone analogues for the treatment of endometriosis: long-term follow-up. *Fertil Steril*, 1993 Mar;59 (3):511-5.
 83. Ghezzi F, Beretta P, Franchi M et al. Recurrence of ovarian endometriosis and anatomical location of the primary lesion. *Fertil Steril*, 2001 Jan;75(1):136-40.
 84. Rice VM. Conventional medical therapies for endometriosis. *Ann NY Acad Sci*, 2001 Mar; 955: 343-59.
 85. Prentice A, Deary AJ, Bland E. Progestagens and anti-progestagens for pain associated with endometriosis (Cochrane review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD002122. Review. Update in: *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;3:CD002122.
 86. Telimaa S, Puolakka J, Ronnberg L et al. Placebo-controlled comparison of danazol and high-dose medroxyprogesterone acetate in the treatment of endometriosis. *Gynecol Endocrinol*, 1987 Mar; 1(1): 13-23.
-

-
87. Dlugi AM, Miller JD, Knittle J. Lupron depot (leuprolide acetate for depot suspension) in the treatment of endometriosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind study *Fertil Steril*, 1990 Sep; 54(3): 419-27.
 88. Olive DL, Pritts EA. The treatment of endometriosis: a review of the evidence. *Ann NY Acad Sci*, 2001 Mar; 955: 360-72.
 89. VercelliniP, Cortesi I, Crosignani PG. Progestins for symptomatic endometriosis: a critical analysis of the evidence. *Fertil Steril*, 1997 Sep;68(3):393-401.
 90. Venturini PL, et al. Endocrine, metabolic, and clinical effects of gestrinone in women with endometriosis. *Fertil Steril*, 1989 Oct;52(4):589-95.
 91. Fedele L, et al. Gestrinone versus danazol in the treatment of endometriosis. *Fertil Steril*, 1989 May;51(5):781-5.
 92. Meola J, Rosa, Silva JC et al. Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Fert Steril*, 2009; 93(6): 1750-73.
 93. Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell*, 1994 Jul;78(2):191-201.
 94. Hewitt SC, Harrell JC, Korach KS. Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. *Annu Rev Physiol*, 2005;67:285-308.
 95. Lu Z, Hardt J, Kim JJ. Global analysis of genes regulated by HOXA10 in decidualization reveals a role in cell proliferation. *Mol Hum Reprod*.2008 Jun;14(6):357-66.
 96. Benson GV, Lim H, Paria BC et al. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development*, 1996 Sep; 122(9):2687-96.
 97. Redwine DB. Mulleriosis. The single best fit model of the origin of endometriosis. *Reprod Med*, 1988;33:11:915-20.
 98. Nakayama K, Masuzawa H, Li SF, et al. Immunohistochemical analysis of the peritoneum adjacent to endometriotic lesions using antibodies for Ber-EP4 antigen, estrogen receptors, and progesterone receptors: implication of peritoneal metaplasia in the pathogenesis of endometriosis. *Int J Gynecol Pathol*, 1994 Oct;13(4):348-58.
 99. Vitiello D, Pinard R, Taylor HS. Gene expression profiling reveals putative HOXA10 downstream targets in the periimplantation mouse uterus. *Reprod Sci*, 2008 May; 15(5):529-35.
 100. Ratner E, Lu L, Boeke M, et al. A KRAS-variant in ovarian cancer acts as a genetic marker of cancer risk. *Cancer Res*, 2010 Aug; 70(16):6509-15.
-

101. Lai EC, Tomancak P, Williams RW et al. Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol*, 2003; 4(7):R42.
 102. Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Develop*. *Genes and Develop*, 2003 Apr; 17(8): 991-1008.
 103. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs down regulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 2005 Feb; 433 (7027): 769-73.
 104. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005 Jan; 120(1): 15-20.
 105. Pan Q, Luo X, Toloubeydokhti T, et al. The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. *Mol Hum Reprod*, 2007 Nov;13(11):797-806.
 106. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993 Dec;75(5): 843-54.
 107. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J*, 2004 Oct;23(20):4051-60.
 108. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003 Sep;425(6956):415-9.
 109. Lund E, Guttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 2004 Jan;303(5654):95-8.
 110. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001 Jan; 409(6818):363-6.
 111. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 2003 Oct;115(2):199-208.
 112. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006 Apr;6(4):259-69.
 113. Brennecke J, Stark A, Russell RB, et al. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 2005 Mar;3(3):e85.
 114. Almeida MI, Reisb RM, Calina GA. Mini review MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research*, 2011 Dec; 717(1-2): 1-8.
 115. Burney RO, Hamilton AE, Aghajanova L, et al. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Mol Hum Reprod*, 2009 Oct;15(10):625-31.
-

116. Winter, J et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 2009 Mar; 11(3), 228 – 34.
 117. Hong X, Luense LJ, McGinnis LK, et al. Dicer1 is essential for female fertility and normal development of the female reproductive system. *Endocrinology*, 2008 Dec;149(12):6207-12.
 118. Ohlsson Teague EM, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, et al. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol*, 2009 Feb;23(2):265-75.
 119. Navarro A, Diaz T, Martinez A, et al. Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2009 Oct;114(14):2945-51.
 120. Wu H, Huang M, Cao P, et al. MiR-135a targets JAK2 and inhibits gastric cancer cell proliferation. *Cancer Biol Ther*, 2012 Mar;13(5):281-8.
 121. Söber S, Laan M, Annilo T. MicroRNAs miR-124 and miR-135a are potential regulators of the mineralocorticoid receptor gene (NR3C2) expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010 Jan;391(1):727-32.
 122. Pang RT, Liu WM, Leung CO, et al. miR-135A regulates preimplantation embryo development through down-regulation of E3 Ubiquitin Ligase Seven In Absentia Homolog 1A (SIAH1A) expression. *PLoS One*, 2011;6(11):e27878.
 123. Schaap-Oziemlak AM, Raymakers RA, Bergevoet SM, et al. MicroRNA hsa-miR-135b regulates mineralization in osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells. *Stem Cells Dev*, 2010 Jun;19(6):877-85.
 124. Matsuyama H, Suzuki HI, Nishimori H, et al. miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, 2011 Dec 22;118(26):6881-92.
 125. Nagel R, le Sage C, Diosdado B, et al. Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res*, 2008 Jul;68(14):5795-802.
 126. Chen Y, Zhang J, Wang H, et al. miRNA-135a promotes breast cancer cell migration and invasion by targeting HOXA10. *BMC Cancer*, 2012 Mar;12:111.
 127. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*, 2001 Dec; 25(4), 402-8.
 128. Canis M, Donnez JG, Guzick DS, Halme JK, Rock JA, Schenken RS, Vemon MW: Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*, 1997 May, 67(5):817-21.
 129. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol*, 1975 May;122(2):262-3.
-

-
130. Burney RO et al. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology*, 2007 Aug; 148(8):3814-26.
 131. Aghajanova, L;Giudice , L. Molecular Evidence for Differences in Endometrium in Severe Versus Mild Endometriosis. *Reprod Sci*, 2011 Mar;18(3):229-51.
 132. Zanatta A, Serafini PC. HOXA10 as well as estrogen and progesterone receptor protein expression in the epithelium, stroma, and adjacent smooth muscle of rectosigmoid endometriosis. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 2014 Aug;36(8):381.
 133. Lin SC et al. Hypoxia-Induced MicroRNA-20a Expression Increases ERK Phosphorylation and Angiogenic Gene Expression in Endometriotic Stromal Cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012 Aug; 97(8):E1515–E23.
 134. Ramón LA, Braza-Boïls A, Gilabert-Estellés J, et al. microRNAs expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors. *Hum Reprod*, 2011 May;26(5):1082-90.
 135. Shi, XY et al. Downregulation of miR-183 inhibits apoptosis and enhances the invasive potential of endometrial stromal cells in endometriosis. *Int J of Mol Med*, 2014 Jan; 33(1): 59-67.
 136. Hull, ML and Nisenblat, V. Tissue and circulating microRNA influence reproductive function in endometrial disease. *Reprod Biomed Online*. 2013 Nov;27(5):515-29.
 137. Santamaria, X and Taylor, T. MicroRNA and gynecological reproductive diseases. *Fert and Ster*, 2014 Jun; 101(6): 1545-51.
 138. Cho, SH et al. Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers for Endometriosis. Apresentado como pôster no SGI 2014, 26-29 de Março, Florença, Itália.
 139. Gilabert-Estellés, J et al. Role of microRNAs in Gynecological Pathology. *Current Medicinal Chemistry*, 2012; 19(15): 2406-13.
 140. Toloubeydokhti T, Pan Q, Luo X, et al. The Expression and Ovarian Steroid Regulation of Endometrial Micro-RNAs. *Reprod Sci*, 2008 Dec; 15(10): 993-1001.
 141. Daí L, Gu L, Di W. MiR-199a attenuates endometrial stromal cell invasiveness through suppression of the IKK β /NF- κ B pathway and reduced interleukin-8 expression. *Mol Hum Reprod*, 2012 Mar; 18 (3):136-45.
 142. Shen, L et al. MicroRNA23a and MicroRNA23b Deregulation Derepresses SF-1 and Upregulates Estrogen Signaling in Ovarian Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013 Apr; 98(4):1575-82.
-

-
143. Braza-Boils A, et al. MicroRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. *Human Reproduction*, 2014 May; 29(5): 978-88.
 144. Braza-Boils, A et al. Peritoneal Fluid Reduces Angiogenesis-Related MicroRNA Expression in Cell Cultures of Endometrial and Endometriotic Tissues from Women with Endometriosis. *PLoS One*, 2013 Apr 19;8(4):e62370.
 145. Wang, WT et al. Circulating MicroRNAs Identified in a Genome-Wide Serum MicroRNA Expression Analysis as Noninvasive Biomarkers for Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, Jan 2013; 98(1):281-9.
 146. Hawkins SM et al. Functional MicroRNA Involved in Endometriosis. *Mol Endocrinol*, 2011 May;25(5):821-32.
 147. Nothnick, WB et al. miR-451 Deficiency Is Associated with Altered Endometrial Fibrinogen Alpha Chain Expression and Reduced Endometriotic Implant Establishment in an Experimental Mouse Model. *PLoS One*, 2014 Jun;9(6):e100336.
-

ANEXOS

ANEXO 1 - APROVAÇÃO COMISSÃO CIENTÍFICA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE MEDICINA
COMISSÃO CIENTÍFICA

Porto Alegre, 20 de novembro de 2012.

Senhor (a) Pesquisador(a)

A Comissão Científica da Faculdade de Medicina e do Hospital São Lucas da PUCRS aprovou seu projeto de pesquisa intitulado "Expressão do microRNA 135 em lesões de endometriose em pacientes submetidas a tratamento cirúrgico".

O projeto, assim como todos os documentos que o acompanharam, os quais receberam a presente aprovação, devem ser submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa/PUCRS através da Plataforma Brasil, nas mesmas versões apresentadas a Comissão.

Atenciosamente,

Profª Dra Bartira E. Pinheiro da Costa
Coordenador da Comissão Científica
FAMED-HSL/PUCRS

Ao Profa Dra Denise Cantarelli Machado



FACULDADE DE MEDICINA – HSL/PUCRS
Av. Ipiranga, 6690 – P. 60 – 3º andar – CEP 90610-000
Porto Alegre – RS – Brasil
Fone: (51) 3320-3304 – Fax (51) 3320-3040
E-mail: nuclem@pucrs.br
www.pucrs.br/medicina

ANEXO 2 - APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA – PLATAFORMA BRASIL

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Expressão do microRNA 135 em lesões de endometriose em pacientes submetidas a tratamento cirúrgico

Pesquisador: Denise Cantarelli Machado

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 09257813.0.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 228.944

Data da Relatoria: 13/03/2013

Apresentação do Projeto:

A endometriose foi inicialmente descrita em 1860 e ainda hoje não é bem elucidada. É uma doença progressiva, dependente de estrogênio, que se manifesta pela presença de glândulas endometriais e estroma fora da cavidade uterina, sendo que os locais mais freqüentes de implantação são as vísceras pélvicas e o peritônio. O aspecto das lesões e o tamanho podem variar, desde lesões microscópicas ou pequenos pontos avermelhados na superfície peritoneal até cistos endometrióticos maciços que distorcem a anatomia tubo ovariana e formam extensas aderências. A forma grave da doença pode envolver bexiga, intestino, ureter, septo retovaginal e até mesmo órgãos não pélvicos como pulmão, pericárdio e cérebro. A etiologia ainda desconhecida da endometriose tem, entre suas teorias, a metaplasia celômica, na qual o epitélio celômico, distribuído aleatoriamente na pelve durante o desenvolvimento embrionário, sofreria modificações. Pacientes com endometriose apresentam níveis menores de expressão do HOXA10 no endométrio tópico no período da janela da implantação. Esta baixa expressão pode justificar a falha de implantação detectada nas pacientes com endometriose e explicar a infertilidade neste grupo. A endometriose e falha de implantação levando a infertilidade foram demonstradas em camundongos fêmeas com ausência do gene HOXA10, nos quais os embriões normais não eram capazes de implantar, no entanto os embriões mutantes eram capazes de se implantar em outro útero. A presença do HOXA10 no tecido endometriótico ectópico sugere que a expressão deste

Endereço: Av. Ipiranga, 6681

Bairro:

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)320-3345

Fax: (51)320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



gene é necessária para o desenvolvimento do novo tecido endometrial. Desta forma fica claro que esta relação não é necessária somente para a reestruturação do endométrio tópico a cada ciclo menstrual, mas também para a formação do tecido endometrial ectópico. Existem diversas funções celulares que ocorrem de forma fisiológica no endométrio cíclico e no estabelecimento da endometriose que já foram relacionadas a miRNAs sugerindo uma possível função destes na regulação da expressão gênica no endométrio e/ou nas desordens relacionadas a este. Diversos estudos identificaram diferentes miRNAs no tecido endometrial ectópico e sugerem que estes estão relacionados com a fisiopatologia da endometriose por apresentarem expressão alterada quando comparados ao tecido endometrial tópico. Ao analisar a expressão dos miRNAs nas pacientes com endometriose e relacionar com as vias (que mediam inflamação, remodelamento tecidual, apoptose, proliferação celular, angiogênese e cicatrização) que eles coordenam, observa-se que há uma importante diferença no tecido endometrial tópico e no ectópico. A maioria dos miRNAs identificados mostram-se menos expressos nas pacientes com endometriose quando comparados com pacientes livres da doença. A diferença dos miRNAs entre o tecido endometrial tópico e o ectópico já encontrada estão relacionadas à codificação de proteínas por diferentes genes envolvidos na adesão celular, remodelamento da matriz extracelular, migração e proliferação, regulação do sistema imune além de diversos mecanismos relacionados diretamente com o estabelecimento dos implantes endometriais tais como adesão das células endometriais no peritônio, invasão e proliferação no mesotélio e sobrevivência das células endometriais ectópicas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a expressão dos microRNA 135a e 135b no endométrio ectópico e tópico

Objetivo Secundário:

Descrever a expressão do miRNA 135a e 135b no endométrio ectópico.

Descrever a expressão do miRNA 135a e 135b no endométrio tópico.

Comparar a expressão do miRNA 135a e 135b no endométrio ectópico com a expressão no tecido endometrial tópico. Descrever a expressão do gene HOXA10 no endométrio ectópico.

Descrever a expressão do gene HOXA10 no endométrio tópico.

Comparar a expressão do gene HOXA10 no endométrio ectópico e tópico.

Verificar a relação da expressão do MiRNA 135a e MiRNA135b no endométrio ectópico com a expressão do gene HOXA10.

Avaliar a expressão do miRNA 135a e miRNA 135b no endométrio ectópico nas diferentes fases do ciclo menstrual.

Endereço: Av. Ipiranga, 6681

Bairro:

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)320-3345

Fax: (513)320-3345

E-mail: cep@puccrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Comparar a expressão do gene HOXA10 no endométrio ectópico nas diferentes fases do ciclo menstrual.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Em relação a riscos, não há risco adicional para as pacientes visto que o material coletado faz parte do procedimento cirúrgico ao qual a paciente será submetida.

Benefícios: Os benefícios poderão ser em longo prazo, após resultados do trabalho que poderão ser úteis para melhor elucidação da doença e conseqüentemente nas descobertas de tratamentos mais eficazes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda incluindo a Santa Casa como co-participante. Desta forma, serão incluídas como amostra, além das pacientes oriundas do serviço de Ginecologia do HSL-PUC, todas as pacientes do serviço de Ginecologia da Santa Casa de Porto Alegre, submetidas a cirurgia no período determinado (de maio de 2013 a outubro de 2014), que aceitarem a participar do estudo assinando TCLE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos necessários para esta emenda foram anexados.

Recomendações:

Não existem recomendações para a emenda que inclui as pacientes da Santa Casa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências para a emenda que inclui as pacientes da Santa Casa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 25 de Março de 2013

Assinador por:
Rodolfo Herberto Schneider
(Coordenador)

Endereço: Av. Ipiranga, 6681
Bairro: CEP: 90.619-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)320-3345 **Fax:** (51)320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título completo do estudo: Expressão do microRNA 135 em lesões de endometriose em pacientes submetidas a tratamento cirúrgico

Investigador: Rafaella Gehm Petracco

(Médico do estudo):

Endereço: Avenida Ipiranga, 6690/801 – Porto Alegre - RS

Número de telefone: (51) 3339-1142

(51) 99593055

Introdução

Você está sendo convidada para fazer parte de um estudo clínico. Antes que você decida participar desta pesquisa, é importante que entenda por que esta pesquisa está sendo realizada. Leia as informações a seguir cuidadosamente antes de discuti-las com o médico do estudo.

A decisão de participar deste estudo cabe a você. A sua participação é totalmente voluntária.

A sua decisão não vai afetar o seu relacionamento com seu médico ou alterar os cuidados médicos atuais ou futuros de nenhuma forma.

Pergunte ao médico responsável pelo estudo sobre qualquer item que não esteja claro para você. Não tenha pressa para decidir se deseja participar deste estudo.

Qual a finalidade deste estudo?

Atualmente a endometriose é uma doença que afeta muitas mulheres, mesmo com todos os estudos já realizados, ainda não se sabe ao certo porque a endometriose ocorre. Este estudo tem como objetivo pesquisar fatores que possam estar relacionados ao aparecimento da endometriose.

Como será feito o estudo?

Você está prestes a ser submetida a cirurgia para diagnosticar ou para tratar uma doença chamada endometriose. Este procedimento ocorrerá no bloco cirúrgico sob anestesia, como já deve ter sido explicado pelo seu médico. Durante este procedimento uma câmera será introduzida pelo colo do útero para observar a cavidade uterina (ou cavidade endometrial), após a realização deste procedimento, se não for encontrado nenhuma anormalidade, será coletado uma pequena amostra do tecido endometrial (desta camada de dentro do útero). Este tecido é novamente formado a cada ciclo menstrual, portanto essa pequena porção que será retirada não lhe causará dano nenhum. Após este procedimento você será submetida a videolaparoscopia, na qual outra câmera será introduzida pelo seu umbigo para avaliar a cavidade abdominal. Neste momento se for encontrado qualquer foco de endometriose eles serão retirados, como forma de tratar a doença. Uma pequena porção deste tecido retirado

Rubrica do sujeito da pesquisa

Rubrica do médico estudo

será usado para o estudo e o restante será enviado para estudo anátomo patológico que é o procedimento de rotina neste tipo de cirurgia.

Quais os possíveis riscos e efeitos colaterais?

Não há nenhum risco ou efeito colateral que possa ser causado exclusivamente pela realização do estudo visto que os procedimentos serão feitos rotineiramente para a cirurgia a qual você será submetida.

O estudo não requer que você se submeta a nenhum outro procedimento ou exame adicional que não faça parte de um tratamento padrão para o seu problema de saúde atual segundo os padrões normais de prática do seu médico.

Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você estará autorizando que sua informação médica relacionada ao estudo seja analisada e estas informações publicadas na literatura médica mantendo sempre sob sigilo sua identidade. Na ocasião da publicação dos resultados desta pesquisa, sua identidade será mantida no mais rigoroso sigilo. Serão omitidas todas as informações que permitam identificá-la.

Caso tenha alguma preocupação ou dúvida com relação à sua participação neste estudo, entre em contato com Dra Rafaella Petracco: (51) 33391142 ou (51) 99593055 (celular 24 horas)

No entanto, se tiver alguma queixa ou preocupação sobre a maneira como o médico do estudo realizou o estudo, questões sobre a pesquisa e sobre os seus direitos enquanto envolvida no projeto ou problemas decorrentes da pesquisa, você pode entrar em contato com o responsável pelo **Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, pelo telefone: (51) 3320-3345 localizado na Avenida Ipiranga 6690- Prédio 60 - Sala 314 - Porto Alegre - RS – Brasil - CEP: 90610-900 (horário de funcionamento: das 8:00 as 17:00 horas).

Ou Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – sob coordenação Dr. Cláudio Telöken, telefone 3214.8571.

Eu concordo em participar deste estudo de pesquisa realizado por Rafaella Petracco.

Eu tive tempo para refletir sobre a participação nesse estudo.

Posso, a qualquer momento, se desejar, interromper minha participação sem fornecer nenhum motivo. Informarei minha decisão ao médico do estudo. Posso, a qualquer momento, pedir informações adicionais ao médico do estudo ou ao médico indicado por ele.

Nome do sujeito da pesquisa:

Assinatura do sujeito da pesquisa: Data ___/___/___

Nome do médico do estudo:

Assinatura do médico do estudo: Data ___/___/___

Nome da testemunha*:.....

Assinatura da testemunha*:..... Data ___/___/___

*A assinatura da testemunha é necessária apenas se a paciente não puder ler ou fornecer consentimento por escrito.

ANEXO 4 - QUESTIONÁRIO

Número da amostra:

Data de nascimento:

Raça:

Número de filhos e via de parto:

Tempo em que sabe que tem endometriose ou que tem sintomas suspeitos:

Tempo do ciclo menstrual (início de uma menstruação até o início da próxima):

Duração do fluxo:

Intensidade do fluxo menstrual:

Classificação da cólica (nota de 0 a 10):

Data da última menstruação:

ANEXO 5 - CLASSIFICAÇÃO REVISADA PELA ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE MEDICINA REPRODUTIVA EM 1997

Appendix

The Revised AFS Classification of Endometriosis

AFS Classification of Endometriosis

Patient's Name _____ Date _____

Stage I (Minimal) - 1-5
 Stage II (Mild) - 6-15
 Stage III (Moderate) - 16-40
 Stage IV (Severe) - > 40

Laparoscopy _____ Laparotomy _____ Photography _____

Recommended Treatment _____

Total _____ Prognosis _____

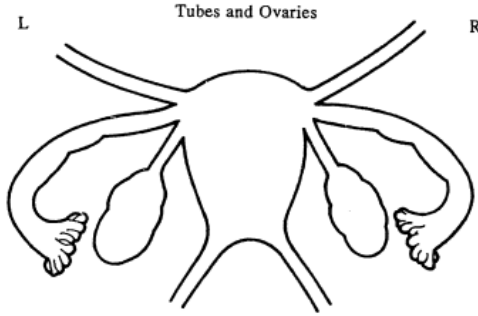
PERTONEUM	ENDOMETRIOSIS	< 1cm	1-3cm	> 3cm
		Superficial	1	2
	Deep	2	4	6
OVARY	R Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
	L Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION		Partial		Complete
		4		40
OVARY	ADHESIONS	< 1/3 Enclosure	1/3 - 2/3 Enclosure	> 2/3 Enclosure
	R Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	L Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	TUBE	R Filmy	1	2
Dense	4*	8*	16	
L Filmy	1	2	4	
Dense	4*	8*	16	

* If the fimbriated end of the fallopian tube is completely enclosed, change the point assignment to 16.

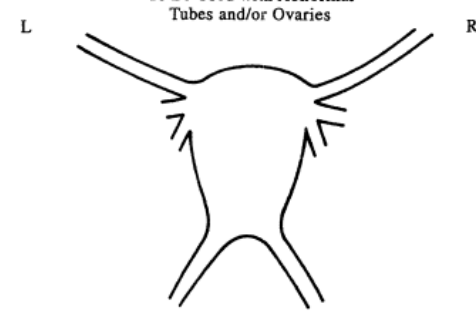
Additional Endometriosis: _____

Associated Pathology: _____

To Be Used with Normal Tubes and Ovaries




To Be Used with Abnormal Tubes and/or Ovaries




EXAMPLES & GUIDELINES

STAGE I (MINIMAL)




PERITONEUM			
Superficial Endo	-	1-3cm	- 2
R. OVARY			
Superficial Endo	-	<1 cm	- 1
Filmy Adhesions	-	<1/3	- 1
TOTAL POINTS			4

STAGE II (MILD)




PERITONEUM			
Deep Endo	-	>3cm	- 6
R. OVARY			
Superficial Endo	-	<1cm	- 1
Filmy Adhesions	-	<1/3	- 1
L. OVARY			
Superficial Endo	-	<1cm	- 1
TOTAL POINTS			9

STAGE III (MODERATE)




PERITONEUM			
Deep Endo	-	>3cm	- 6
CULDESAC			
Partial Obliteration			- 4
L. OVARY			
Deep Endo	-	1-3cm	- 16
TOTAL POINTS			26

STAGE III (MODERATE)



PERITONEUM			
Superficial Endo	-	>3cm	- 4
R. TUBE			
Filmy Adhesions	-	<1/3	- 1
R. OVARY			
Filmy Adhesions	-	<1/3	- 1
L. TUBE			
Dense Adhesions	-	<1/3	- 16 *
L. OVARY			
Deep Endo	-	<1cm	- 4
Dense Adhesions	-	<1/3	- 4
TOTAL POINTS			30


STAGE IV (SEVERE)



PERITONEUM			
Superficial Endo	-	>3cm	- 4
L. OVARY			
Deep Endo	-	1-3cm	- 32 **
Dense Adhesions	-	<1-3	- 8 **
L. TUBE			
Dense Adhesions	-	<1/3	- 8 **
TOTAL POINTS			52

*Point assignment changed to 16
**Point assignment doubled

STAGE IV (SEVERE)



PERITONEUM			
Deep Endo	-	>3cm	- 6
CULDESAC			
Complete Obliteration			- 40
R. OVARY			
Deep Endo	-	1-3cm	- 16
Dense Adhesions	-	<1/3	- 4
L. TUBE			
Dense Adhesions	-	>2/3	- 16
L. OVARY			
Deep Endo	-	1-3	- 16
Dense Adhesions	-	>2/3	- 16
TOTAL POINTS			114

Determination of the stage or degree of endometrial involvement is based on a weighted point system. Distribution of points has been arbitrarily determined and may require further revision or refinement as knowledge of the disease increases.

To ensure complete evaluation, inspection of the pelvis in a clockwise or counterclockwise fashion is encouraged. Number, size and location of endometrial implants, plaques, endometriomas and/or adhesions are noted. For example, five separate 0.5cm superficial implants on the peritoneum (2.5 cm total) would be assigned 2 points. (The surface of the uterus should be considered peritoneum.) The severity of the endometriosis or adhesions should be assigned the highest score only for peritoneum, ovary, tube or culdesac. For example, a 4cm superficial and a 2cm deep implant of the peritoneum should be given a score of 6 (not 8). A 4cm deep endometrioma of the ovary associated with more than 3cm of superficial disease should be scored 20 (not 24).

In those patients with only one adnexa, points applied to disease of the remaining tube and ovary should be multiplied by two. **Points assigned may be circled and totaled. Aggregation of points indicates stage of disease (minimal, mild, moderate, or severe).

The presence of endometriosis of the bowel, urinary tract, fallopian tube, vagina, cervix, skin etc., should be documented under "additional endometriosis." Other pathology such as tubal occlusion, leiomyomata, urine anomaly, etc., should be documented under "associated pathology." All pathology should be depicted as specifically as possible on the sketch of pelvic organs and means of observation (laparoscopy or laparotomy) should be noted.

ANEXO 6 - ORIGINAL ARTICLE

TITLE: miR135 IS DOWN REGULATED DURING THE SECRETORY PHASE IN PATIENTS WITH ENDOMETRIOSIS

Petracco, Rafaella^{a,c,d}; Dias, Ana Cristina de Oliveira^b; Heldt, Fagnera Henrique^a, Taylor, Hugh^c; Michelon, João da Rosa^d, Petracco, Alvaro^d; Badalotti, Mariangela^d, Machado, D. C.^a.

^a Biomedical Research Institute, School of Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul.

^b Quatro G Research and Development, Porto Alegre, RS, Brazil

^cDepartment of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, Yale School of Medicine, New Haven.

^d Fertilitat Centro de Medicina Reprodutiva, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Denise Cantarelli Machado,

e-mail: dcm@pucrs.br

Av. Ipiranga 6690, Porto Alegre, RS

Brazil,

CEP 90610-000.

fone: 55 51 3320 3000 ext. 2364

fax: 55 55 3320 3312

ABSTRACT

Objective: The pathogenesis of endometriosis still unclear and there is evidence for a role of genetic components. The microRNA 135a and 135b (miR135) is known to silence gene expression and increased miR135 down-regulated the HOXA10 gene, a key mediator of endometrial receptivity and implantation. Considering that several genes are known to be differentially expressed in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis, we compared the expression of miR135 in those tissues during the menstrual cycle.

Design: Samples obtained from twenty three patients submitted to laparoscopic were analyzed. To determine the miRNA expression we used the poly (A) RT-PCR method and gene transcripts were amplified by real-time PCR using the U6 as a house keeping control.

Results: All endometriosis lesions samples expressed miR135. Similar expression levels of miR135 were detected in the ectopic when compared with eutopic endometrium. However, during the secretory phase the expression of miR135 was down regulated comparing to the proliferative phase.

Conclusions: miR135 is down regulated during the secretory phase of women with endometriosis. This finding is likely due to physiological lower levels of estrogen and higher levels of progesterone during this phase. But more evidence are still necessary.

Keywords: endometriosis, microRNA135, HOXA10, implantation, infertility

INTRODUCTION

Since 1860 (Rokitansky, C), when it was first described, the etiopathogeny of endometriosis is still not fully understood. It is an estrogen dependent and progressive disease that is characterized by the presence of endometrial cells (epithelial and stromal) outside the uterus with the most frequent sites being the pelvic organs and peritoneum. Histopathological study is mandatory to confirm the diagnosis, and although its prevalence is not clear, it affects 5 to 10% of women in reproductive age and up to 50% of women with infertility (Snesky and Liu, 1980; Houston, 1884; Cramer, 1987). The most common symptom is pain, characterized by dysmenorrhea, dyspareunia or even chronic pelvic pain, and frequently these symptoms are associated with infertility.

There are many evidences that environmental, hormonal, immunological and genetic components are involved (Giudice and Kao, 2004), and some studies have shown that epigenetic factors and adults stem cells have influence on its genetic compounds (Lee et al., 2009; Du and Taylor, 2007). It has been described an estrogen receptor gene polymorphisms and various exon-deleted progesterone receptor mRNA involved with endometriosis. Different studies identified aneuploidies in chromosomes 11, 16 and 17 and loss of heterozygosity in chromosomes 9, 11 and 22 when comparing eutopic endometrium of patients with and without the disease (Jiang et al., 1996; Kosugi et al., 1999; Gogusev et al., 1999; Kennedy, 2003; Bischoff and Simpson, 2000) suggesting that the genetic involvement is related with the development and progression of endometriosis

HOXA10 is a well known gene that is directly involved in the embryogenesis of the uterus and embryo implantation. The role of HOXA10 in the pathogenesis of endometriosis has been largely investigated, and it has a cyclic expression under influence of steroids hormones (Taylor et al., 1997; Cermik et al., 2001; Zanatta, 2010). Lower levels of HOXA10 expression are found in the endometrium during implantation window in endometriosis patients which could explain the implantation failure and higher incidence of infertility shown by this group of patients (Taylor, et al., 1999).

MicroRNAs (miRNAs) are small single strand noncoding RNA containing about 22 nucleotides, essential for gene regulation (Bartel, 2009), and able to control many genes at the same time. MiRNAs are associated with different physiological process such as apoptosis, differentiation, and hematopoiesis. The aberrant expression of miRNAs are associated to many diseases, specially different types of cancers, due its role in cell function such as proliferation, differentiation and apoptosis (Croce, 2008).

Endometrial disorders such as impaired endometrial receptivity, dysfunctional uterine bleeding and endometriosis are thought to arise from aberrations in the cellular and molecular homeostasis of the endometrium. Indeed, miRNAs have been differentially expressed in the ovaries, oviduct, endometrium, myometrium and cervix, in normal and pathological tissue suggesting a relationship with the physiopathology of many diseases, including endometriosis, because of aberrant expression when compared to eutopic endometrium tissue (Ohlsson et al., 2010; Filigheddu et al., 2010).

The difference in miRNA expression between eutopic and ectopic endometrial tissue are related to protein codification by different genes involved in cell adhesion, extracellular matrix remodeling, migration, proliferation, immune system regulation, and others mechanisms directly related to the establishment of endometriosis implants (Wu et al., 2006; Eyster, et al., 2007). The miRNA135 (miR135) has two subtypes: 135a and 135b, and most of researches have evaluated only the expression of one subtype, since that they target different genes. Previously, our group has shown an inverse correlation between the miR135 with HOXA10 expression in patients with endometriosis where we detected that HOXA10 was aberrantly regulated in the endometrium of women with endometriosis by both miR135a and miR135b, proving the role of HOXA10 in the pathogenesis of endometriosis and its association with the specific miR135 (Petracco et al., 2012). Moreover, it was also found that miR135 is upregulated in different phases of the menstrual cycles and has cell specificity, suggesting that the alterations seen early, in the proliferative phase, can be related to a failure that will go on during implantation window (Petracco et al., 2011, Petracco et al., 2012). HOXA10 expression in endometriosis lesions has been studied and is down regulated when compared to eutopic endometrium. Also, the relation between HOXA10 and

miRNA135a e miRNA135b has been detected in the eutopic endometrium. However the expression of this specific miRNA has never been evaluated in the ectopic endometrial tissue. The aim of this study was to evaluate the miRNA135a e 135b expression in the ectopic and eutopic endometrium and during the different phases of the menstrual cycle.

MATERIAL AND METHODS

Subjects and tissue collection

Thirty one subjects who underwent surgery for diagnosis or treatment of endometriosis were recruited between March 2013 through May 2014 to participate. The study was approved by the Ethical Committee from the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul(PUCRS) and Santa Casa Hospital, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. After they signed the informed consent, endometrial biopsies and excision of endometriosis lesions were obtained from women with both surgical and histological diagnosis of endometriosis. Biopsies were performed using a Pipelle catheter (CCD International, Paris, France). The diagnosis of endometriosis was confirmed by histology in all women. Exclusion criteria included the use of hormonal medications or supplements within the 3 months before surgery, pregnancy, cancer, endometrial pathologies including polyps and submucosal/intramural fibroids, or those patients who did not know their last menstrual period or refuse to participate in the study. Out of the 31 subjects included, 8 were excluded because mRNA levels were too low. After the first analysis the samples were divided according to the menstrual cycle as follows: proliferative, day 1-14 (n=11) and secretory, day 15-28 (n=12).

Quantitative RT-PCR

Eutopic and topic endometrium biopsies were placed in a tube containing RNA later® (Ambion, California, USA) and stored at -80°C until processing. Total RNA was

extracted from the whole tissue using Trizol reagent® (Invitrogen, California, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA samples concentrations were determined using a fluorometer platform (Qubit® 2.0, Invitrogen, California, EUA) using serial dilutions according to manufacturer's instructions.

For miRNA expression determination, we used the poly (A) RT-PCR method using Invitrogen NCode miRNA first-strand cDNA synthesis MIRC-50 kit (Invitrogen, California, USA). Gene transcripts were amplified by real-time PCR in the Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR platform (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) using the forward specific primers to miR135a (5'-TATGGCTTTTTATTCCTATGTGA-3'), and miR135b (5'-TATGGCTTTTCATTCCTATGTGA-3') and the universal reverse primer complementary to the anchor primer. The anchor real-time primer was used as a negative control. Primers for the U6, a small nuclear RNA, (U6 forward: 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3'; reverse: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3') was used as a control to determine the relative miRNA expression.

Real-time PCR was performed using the Supermix SybrGreen and ROX (Quatro G Laboratory, Porto Alegre, Brazil). The 25 ng of cDNA was used for a 50µL total reaction (according to the manufacturer's instructions). The thermal cycling conditions were initiated by uracil-*N*-glycosylase activation at 50°C for 2 min and initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec, and annealing at 57° C for 20 sec. Melting analysis was performed by heating the reaction mixture from 74° C to 99° C at a rate of 0.2 °C/sec. Threshold cycle (Ct) and melting curves were acquired by using the quantitation and melting curve program of the AB 7500 platform. The experiments were done in duplicate. The mRNA level of each sample was normalized according to the U6 gene expression. mRNA relative level was presented using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using unpaired Mann-Whitney test for the ectopic vs. eutopic endometrium samples and for comparison between different

phases of the menstrual cycle. All the analyses were done using SPSS v. 20.0, considering a $P < 0.05$ as significant.

RESULTS

The mean age of the twenty three patients enrolled was 32 years (range from 24 to 40 years old), 16 were nuliparous and 7 had at least one pregnancy. One patient had suspicious for endometriosis for 10 years, 2 for 3 years, 2 for 2 years, 4 for one year, 3 for a few months, and in eleven patients, submitted to surgery for infertility diagnosis, endometriosis was found. The main symptom for surgery was pelvic pain (30.43%), sterility (56.52%), or both (13.04%). Patients had mild or moderate endometriosis (stages II-III, revised ASRM classification system, 1997). The patients were firstly analyzed globally and then divided in different phases of the menstrual cycle, using Noyes criteria (Noyes, 1975).

Expression of microRNA135a in endometriosis lesions

All the 23 samples analyzed have shown a significant amount of miRNA135a in an asymmetric manner. Initially we compared the expression of the miRNA135a in endometriosis lesions with the eutopic endometrium considering all the phases of the menstrual cycle. The expression of miR135a in endometriosis lesions when compared to normal tissue were only 0.37 higher ($p=0.98$), showing that there is no statistical difference between these two tissues (Figure 1, A).

Expression of microRNA135b in endometriosis lesions

We analyzed the miRNA135b in the endometriosis lesions and in the endometrium of all patients, considering both phases of the menstrual cycle. All samples expressed miR135b in an asymmetric manner. We verified that the miRNA135b is upregulated 1.82 times in the ectopic endometrium when compared to

eutopic tissue, but this difference was not statistically significant. ($p=0.808$) (Figure 1, B).

Expression of microRNA135a during the different phases of the menstrual cycle

Patients were divided in two different phases of the menstrual cycle, proliferative and secretory. In the proliferative and secretory phase, there were no differences between the expressions of miRNA135a in the endometriosis lesions comparing to the eutopic endometrium. However, in the secretory phase the miR135a has a lower expression (3.77 times) comparing to the eutopic endometrium in comparison to the proliferative phase ($p=0.013$), suggesting that there is a down regulation of this microRNA in the second phase of the menstrual cycle (Figura 2, A).

Expression of microRNA135b during the different phases of the menstrual cycle

Analyzing the mir135b expression in different phases of the menstrual cycle, we found no difference between the ectopic and eutopic endometrium in the proliferative and secretory phase. However comparing the expression in the secretory to the proliferative phase we found that miR135b had an expression 4.75 times lower in the secretory phase ($p=0.032$) (Figura 2, B).

DISCUSSION

Different profiles of miRNAs have been described in the endometriotic tissue (endometrioma, peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and others) and compared to the expression in the eutopic endometrium of non paired patients and with control patients (disease free). The expression of miRNAs in these samples has also been described in different phases of the menstrual cycle.

This study had the purpose to evaluate the expression of two miRNA, 135a and 135b, in ectopic endometrium comparing to topic endometrium of the same patient in different phases of the menstrual cycle. The miR135 expression is upregulated in the eutopic endometrium of patients with endometriosis comparing to the endometrium of free disease patients and has been shown that this aberration is directly involved with HOXA 10 expression.

Studies involving microRNAs and endometriosis have been increasing in the literature. Many authors seek to identify the most prevalent miRNAs using microarray and tries to correlates with genes involved in the pathogenesis of endometriosis. As far as we know, only one publication (from our group) using software to predict miRNA targets have identified the miR135.

Most of the studies tries to identify different miRNA expression, specially, comparing to control patients (free disease), comparing the ectopic to eutopic endometrium. Only a few publications look at this difference in the same patient. In addition many papers have analyzed only the eutopic endometrium and only in certain phase of the menstrual cycle. To the best of our knowledge the current study is the first to compare the miR135 expression comparing ectopic with eutopic endometrium in patients with endometriosis, and in different phases of the menstrual cycle.

The ectopic endometrium seems to be more susceptible to hormonal alterations than the eutopic endometrium, the lesion could suffer more alteration regarding to estradiol fluctuation comparing to the endometrium. Ohlsson and colleagues (2009) evaluated the miRNAs in different phases of the menstrual cycle and did not found any difference when comparing the expression in the proliferative with the secretory phase. Here we could show that the mir135 has a higher expression in the second phase of the menstrual cycle, in which we have lower levels of estradiol and higher levels of progesterone. According to the literature, endometriosis lesions are highly sustained by high levels of estradiol. The regulatory effects that progesterone has on HOXA10 expression justify the higher levels of this gene during the secretory phase of the menstrual cycle; also know as window of implantation. The findings that there are a lower expression of the miR135 during the secretory phase in comparison with the proliferative phase, explain the importance of HOXA10 for embryo implantation. With this finding is essential to realize more

studies comparing this expression in patients with endometriosis with control patients, to check if there are lower levels of the miR135 in patients with endometriosis when comparing to controls.

Another study evaluated the difference in many miRNAs in the same patient (ectopic and eutopic endometrium), they also evaluated the endometrium of patients without the disease and the endometrium of patients with endometriosis but didn't used paired samples. They separated the tissue, epithelial and stromal cells for the analysis and all patients were in the secretory phase. The result was that there were 48 microRNAs that have an altered expression in this comparison, and the miR135 was not listed. Many of the miRNAs they detected were involved with the development and progression of endometriosis and are responsible for process like angiogenesis, inflammation and regulation of the immune system (Pan et al., 2007). Another study using microarray showed that 14 miRNAs had increased, and eight decreased expression in the ectopic endometrium when compared to eutopic. When the authors analyze the data according to the different phases of the menstrual cycle they did not detected any difference among those miRNAs (Ohlsson, et al., 2009)

A study published by Shi et al., 2014, have shown that different miRNAs are expressed in the control eutopic endometrium comparing to ectopic endometrium from patients with endometriosis. One of those is the miR183 that had a lower expression, and increases the potential of invasion inhibiting the apoptosis of endometrial stromal cells. They also found that the miR183 expression can be inhibited by ovarian steroids and inflammatory factors. These findings suggest that aberrant expression of miR183 is involved in the pathogenesis of endometriosis. The present study did not consider the miR135 within different estradiol exposition. However, it is shown that during the secretory phase, when lower levels of estradiol are suppose to be present, there were an alteration of the miR135 expression, suggesting that this hormone may have a direct influence on its expression and consequently on their target genes.

A recent review (Hull and Nisenblat, 2013) have proved that is hard to determine the relation between the pathogenesis of endometriosis and miRNAs expression levels, but they have pointed to an important role of these molecules with the physiopathology of endometriosis. Therefore a further investigation is mandatory

for the development of diagnostic tools and therapeutic approaches through miRNAs manipulation aiming to drive mRNAs expression.

In a large review (Santamaria and Taylor, 2014) regarding the roles of miRNAs in gynecological diseases was shown that six miRNAs have the potential to be used as new tools for diagnosis. Among them, when the miR199a and miR542-3p are used together they have 96.6 and 76.6% of sensibility and specificity. Once more, these findings support the idea that circulating miRNAs can be used as important non invasive biomarkers for diagnosis and to classify different stages of endometriosis.

Two studies described a higher miRNAs expression (1.5 - 2 times) in the ectopic endometrium and the authors did not show differences in the miR135 expression levels supporting our findings. Although we did detect the presence of miR135, the levels were not distinct between the tissues from the same patient.

Maybe the most important that we can emphasize considering all these studies is the diversity of results, specially comparing the same miRNA studied by different authors. The role of many miRNAs in the pathogenesis of endometriosis has been established and proved, however its exact contribution in the development and maintenance of the disease is still not fully understood.

CONCLUSION

There are many evidences that the physiopathology of endometriosis have a genetic compound and many studies have correlated the disease with different miRNAs levels and expression alterations in endometriosis tissue.

We can conclude that miR135 is expressed in the eutopic and topic endometrium in an assimetric manner. The comparison between the eutopic and topic endometrium expression of the miR135 did not show a significant difference. We could detect that the miR135 expression was altered during the menstrual cycle. The miR135 expression (comparing ectopic to topic endometrium) during the secretory phase is down regulated comparing to the proliferative phase.

We can suppose that they have an important role in the homeostasis of the reproductive tissue. Therefore, its aberrant expression can impact the endometrial functioning, impairing embryo implantation.

Although more studies are necessary to elucidate the whole function of miR135 in endometriosis, this miRNA is becoming an important target to the understanding of the pathogenesis of the disease and a possible biomarker to guide diagnosis tools and therapeutic interventions.

REFERENCES

1. Bartel, DP, MicroRNAs: target recognition and regulatory functions *Cell*, 136 (2009), pp. 215-33.
2. Bischoff FZ, Simpson JL. Heritability and molecular genetic studies in endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2000; 6: 37-44.
3. Cermik D, Karaca M, Taylor HS. HOXA10 expression is repressed by progesterone in the myometrium: differential tissue-specific regulation of HOX gene expression in the reproductive tract. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:3387-92.
4. Cramer DW. Epidemiology of endometriosis in adolescents. In: Wilson EA, ed. *Endometriosis*. New York: Alan Liss, 1987: 5-8.
5. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008; 358:502-11.
6. Du H, Taylor HS. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells* 2007; 25:2082-6.
7. Eyster KM, Klinkova O, Kennedy V, et al. Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrium. *Fertil Steril*. 2007; 88(6): 1505-33.
8. Filigheddu N, Gregnanin I, Porporato PE, et al. Differential Expression of MicroRNAs between Eutopic and Ectopic Endometrium in Ovarian Endometriosis. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:369549. Epub 2010 Mar 10.
9. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004; 364:1789-99.
10. Gogusev J, Bouquet de Joliniere J, Telvi L et al. Detection of DNA copy number changes in human endometriosis by comparative genomic hybridization. *Hum Genet*. 1999; 105; 444-51.
11. Houston DE. Evidence for the risk of pelvic endometriosis by age, race, and socioeconomic status. *Epidemiol Rev*. 1984; 6: 167-91.

12. Hull, ML and Nisenblat, V. Tissue and circulating microRNA influence reproductive function in endometrial disease. *Reprod Biomed Online*. 2013 Nov;27(5):515-29.
 13. Jiang X, Hitchcock A, Bryan EJ et al. Microsatellite analysis of endometriosis reveals loss of heterozygosity at candidate ovarian tumor suppressor gene loci. *Cancer Res*. 1996 Aug 1;56(15):3534-9.
 14. Kennedy SH. Genetics of endometriosis: a review of the positional cloning approaches. *Sem Reprod Med*. 2003; 21: 111-8.
 15. Kosugi Y, Elias S, Malinak LR et al. Increased heterogeneity of chromosome 17 aneuploidy in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1999; 180: 792-7.
 16. Lee B, Du H, Taylor HS. Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium. *Biol Reprod* 2009; 80:79-85.
 17. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol*. 1975 May;122(2):262-3.
 18. Ohlsson Teague EM, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, et al. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol*. 2009 Feb;23(2):265-75.
 19. Ohlsson-Teague EM, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update*. 2010 Mar-Apr;16(2):142-65. Epub 2009 Sep 22.
 20. Pan Q, Luo X, Toloubeydokhti T, et al. The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. *Mol Hum Reprod*. 2007 Nov;13(11):797-806.
 21. Petracco R, Grechukhina O, Popkhadze S, et al. MicroRNA 135 regulates HOXA10 expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Dec;96(12):E1925-33.
 22. Petracco RG, Kong A, Grechukhina O, et al. Global Gene Expression Profiling of Proliferative Phase Endometrium Reveals Distinct Functional Subdivisions. *Reprod Sci* 2012 Oct;19(10):1138-45. Epub 2012 May.
 23. Rokitansky, CV. Ueber uterusdrusen-neubildung in uterus and ovaril sarcomen. *Z Ges Aerzte Wein*. 1860; 37: 577-93.
 24. Santamaria, X and Taylor, T. MicroRNA and gynecological reproductive diseases. *Fert and Ster* 2014 Vol. 101, No. 6.
 25. Snesky TE, Liu DT. Endometriosis: associations with menorrhagia, infertility, and oral contraceptives. *Int J Gynaecol Obstet*. 1980; 17: 573-6.
 26. Taylor HS, Vanden Heuvel GB, Igarashi P. A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and
-

persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod* 1997; 57:1338-45.

27. Taylor HS, Bagot C, Kardana A et al. HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1999; 14:1328-31.

28. Wu Y, Kajdacsy-Balla A, Strawn E, et al. Transcriptional characterizations of differences between eutopic and ectopic endometrium. *Endocrinology*. 2006; 147 (1): 232-46.

29. Zanatta A, Rocha AM, Carvalho FM et al. The role of the Hoxa10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis and its related infertility: a review. *J Assist Reprod Genet*. 2010; 27:701-10.

FIGURES

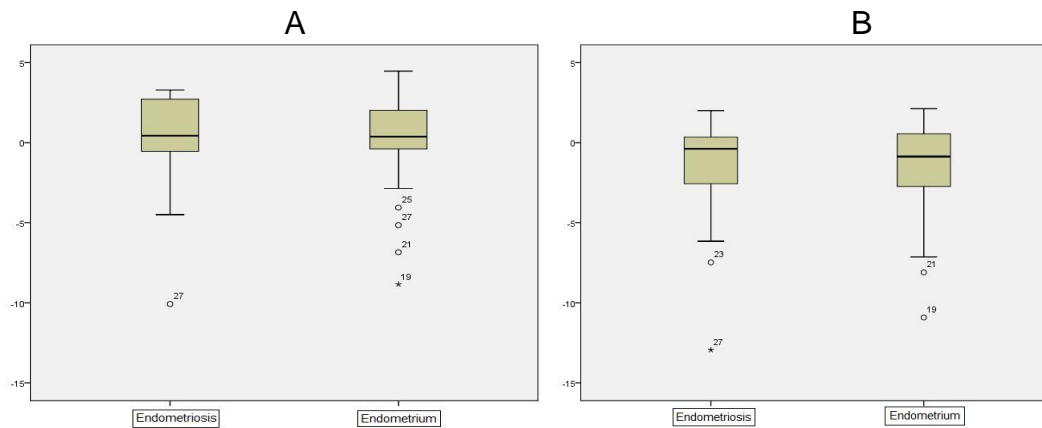


Figure 1. Box plot showing the comparison of miR135a (A) and miR135b (B) expression in ectopic and topic endometrium, analyzing all the 23 patients did not show a significant difference on its expression using Mann Whitney test, $p=0.98$ for miR135a and $p=0.80$ for miR135b.

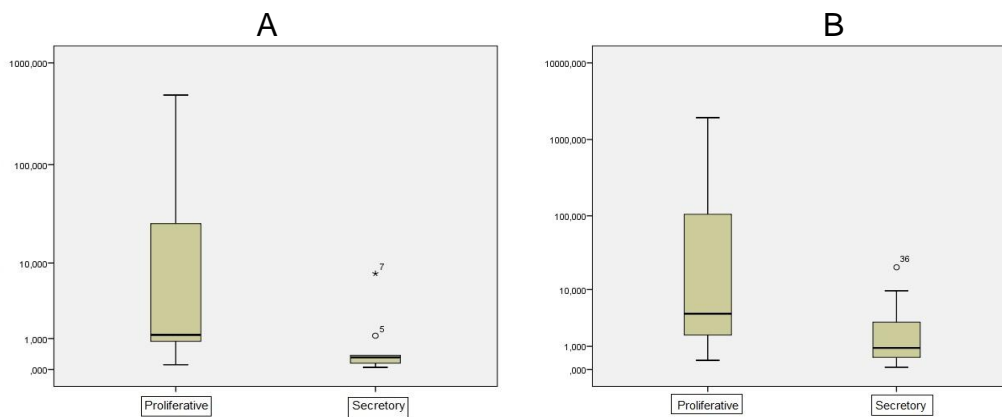


Figure 2. Box plot showing the miR135a (A) and miR135b (B) expression in the proliferative (n=11) and secretory (n=12) phases when compared the ectopic to topic endometrium, showing that miR135 is down regulated during the secretory phase of the menstrual cycle. Statistical analysis using Mann Whitney test, $p<0.05$.