



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRANSLACIONAL**

**MAÍSA VIANA DE HOLANDA BARROS**

**PADRÃO DE METILAÇÃO DAS REGIÕES CONTROLADORAS DE  
*IMPRINTING* GENÔMICO, H19DMR E KvDMR1, EM MULHERES COM  
ENDOMETRIOSE**

**FORTALEZA/CE**

**2025**

MAÍSA VIANA DE HOLANDA BARROS

PADRÃO DE METILAÇÃO DAS REGIÕES CONTROLADORAS DE  
*IMPRINTING* GENÔMICO, H19DMR E KvDMR1, EM MULHERES COM  
ENDOMETRIOSE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Medicina Translacional.

Orientador: Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado  
Coorientadora: Dra. Francisca Andrea da Silva Oliveira

FORTALEZA/CE

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

B279p Barros, Maísa Viana de Holanda.

Padrão de metilação das regiões controladoras de imprinting genômico, H19DMR e KvDMR1, em mulheres com endometriose / Maísa Viana de Holanda Barros. – 2025.  
98 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, Fortaleza, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado.

Coorientação: Profa. Dra. Francisca Andréa da Silva Oliveira.

1. Endometriose. 2. Metilação. 3. Impressão genômica. 4. RNA longo não codificante. I.  
Título.

CDD 610

---

MAÍSA VIANA DE HOLANDA BARROS

PADRÃO DE METILAÇÃO DAS REGIÕES CONTROLADORAS DE  
*IMPRINTING* GENÔMICO, KvDMR E H19DMR1, EM MULHERES COM  
ENDOMETRIOSE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Medicina Translacional.

Aprovada em: 17/10/2025.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado  
(Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Thalita Basso Scandolara  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Maria Claudia dos Santos Luciano  
Instituto do Câncer do Ceará/ICC

---

Prof. Dr. Marcelo Borges Cavalcante  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me conceder a resiliência necessária para seguir nesta jornada em busca do título de doutora e por colocar em meu caminho pessoas tão especiais como as que estão aqui mencionadas.

À minha orientadora, **Cris Libardi**, por aceitar o desafio de me guiar nesta trajetória, mesmo tendo me conhecido há pouco tempo, e por ouvir, acreditar em mim e neste doutorado até mais do que eu mesma. À minha coorientadora, **Andrea Oliveira**, pelos conselhos científicos e pessoais e por ter me ensinado sobre a preparação de biblioteca para sequenciamento.

Às “*epigirls*” **Maria da Conceição Fernandes**, **Vitória Braga** e **Sarah Leyenne** pela disponibilidade em auxiliar a execução dos experimentos. Mesmo com as demandas que cada uma possuía referentes aos seus próprios projetos da pós-graduação, vocês sempre estiveram prontas para ajudar sempre que eu precisava de apoio. À aluna de iniciação científica **Jéssica Almeida**, por ir para a bancada algumas vezes no meu lugar enquanto eu estava dedicada na escrita da qualificação.

Aos participantes da banca de qualificação, **Thalita Scandolara** e Dr. **Marcelo Cavalcante**, pelas válidas contribuições a melhoria do trabalho. Da mesma forma, aos membros da banca da defesa, **Thalita Scandolara**, **Maria Claudia**, Dr. **Marcelo Cavalcante** e **Rosana dos Reis** agradeço pela gentileza em aceitar o convite e pela disponibilidade em dedicar tempo às leituras e considerações, mesmo diante das inúmeras demandas cotidianas.

À minha “dupla” do NPDM, **Mariana Dantas**, por sempre estar disponível para me ajudar com tranquilidade, sempre que eu peço auxílio, tornando as tarefas mais leves, especialmente quando conciliar as atividades de servidora pública e aluna de pós-graduação se tornava desafiador, e pela amizade além do ambiente da UFC. À colega de trabalho, **Luina Benevides**, pelo apoio com as demandas de organização dos eventos das CeGenBio nos momentos em que eu já não conseguia dar conta de tudo. À colega de trabalho e de turma de pós-graduação, **Laís Brasil**, pelas dicas, palavras de incentivo e por compartilhar comigo os desafios dessa jornada.

Aos amigos científicos que o NPDM me presenteou: **Clara Norões, Eduardo Soeiro, Katharine Gurgel, Thaís Brito e Yuri Silva**. Para além dos assuntos relacionados à pesquisa, vocês trouxeram leveza ao cotidiano, seja nas companhias dos almoços, seja nas conversas que tornaram os dias mais divertidos.

Aos professores **Odorico Moraes, Vânia Melo, Raquel Montenegro e Diego Wilke**, pela confiança em meu trabalho e pelos incentivos, cada um a seu modo, na busca deste título.

À minha psicóloga, **Aline Gurgel**, pela ajuda em meu processo de autoconhecimento durante este período desafiador e pelas palavras de acolhimento constantes.

Ao meu tio farmacêutico, **Arnaldo Viana**, por ter me apresentado ao processo seletivo de bolsa de Iniciação Científica durante a faculdade, que despertou em mim o interesse e a motivação pela pesquisa acadêmica.

Aos meus pais, **Maria das Virgens Viana e José Moreira Holanda**, por serem minha base e por, desde cedo, me ensinaram o valor da educação e do esforço. Às minhas irmãs mais velhas, **Milena Holanda e Michelle Holanda**, por serem inspirações ao longo da vida e por terem dedicado seu tempo a me ensinar durante meus anos no ensino fundamental.

Ao meu marido, **Alan Barros**, pela paciência nos meus diversos momentos de estresse, por me lembrar frequentemente que a vida vai muito além do trabalho e dos estudos e por ser o meu principal alicerce emocional. Seu apoio foi fundamental para que eu pudesse seguir nesta jornada. Ao meu gato, **Oliver**, por ser meu despertador durante às madrugadas e pela companhia, mesmo que dormindo ao lado do computador, durante a escrita deste trabalho.

*“Mas a dúvida é o preço da pureza, e  
é inútil ter certeza.”*

Trecho da canção Infinita Highway,  
*Engenheiros do Hawaii*

## RESUMO

A endometriose é uma doença crônica inflamatória caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina, afetando em torno de 10% das mulheres em idade fértil. As manifestações clínicas são bem diversas e a origem da endometriose não é totalmente esclarecida. Entretanto, considera-se que a doença seja multifatorial, com participação de componentes epigenéticos. O *imprinting* genômico está envolvido em pontos-chave do funcionamento fisiológico celular. Assim, a perda de *imprinting* pode levar a ativação de genes que estariam silenciados, ocasionando uma reprogramação epigenética errônea nas células. Nesse estudo, avaliamos o padrão de metilação das regiões H19DMR e KvDMR1 pela técnica de sequenciamento após modificação com bissulfato de sódio, além dos níveis de expressão dos lncRNA *H19* e *KCNQ1OT1* por RT-qPCR de 24 lesões coletadas de diferentes locais da pelve obtidas por videolaparoscopia. Dentre os resultados obtidos, a média de idade foi 33,5 de anos. O local com mais lesões obtidas foi o septo retovaginal (66,7%) e a dismenorreia representou o sintoma mais relatado entre as pacientes. Com relação aos dados do sequenciamento, a média do número de reads foi 42,98%  $\pm$  5,38% metiladas na H19DMR e 58,79%  $\pm$  4,74% metiladas na KvDMR1. Não houve diferença estatística da metilação e a expressão dos lncRNAs obtida entre as classificações da doença, mas observou-se três amostras hipometiladas na H19DMR e duas amostras hipermetiladas na KvDMR1 nas lesões infiltrativas. Verificou-se um predomínio do padrão heterozigoto dos SNPs das regiões rs2107425 (C/T = 53,3%) e rs2071094 (G/T = 66,6%). Foi constatado uma relação entre a expressão de *H19* e a presença de casos na família ( $p = 0,0469$ ) além de correlação negativa ( $p = 0,035/r = -0,498$ ) com IMC. Assim, destaca-se a importância de aprofundar a investigação dos padrões epigenéticos envolvidos na endometriose, considerando sua possível contribuição para a progressão da doença e sua heterogeneidade clínica.

**Palavras-chaves:** Endometriose, metilação, impressão genômica, RNA longo não codificante

## ABSTRACT

Endometriosis is a chronic inflammatory disease characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity, affecting approximately 10% of women of reproductive age. The clinical manifestations are diverse and the origin of endometriosis remains unclear. However, the disease is believed to be multifactorial, with epigenetic components playing a significant role. Genomic imprinting regulates key cellular physiological functions, and its disruption can lead to aberrant gene activation, resulting in epigenetic reprogramming errors. In this study, we evaluated the methylation pattern of the H19DMR and KvDMR1 regions using bisulfite sequencing, as well as the expression levels of lncRNA *H19* and *KCNQ1OT1* by RT-qPCR of 24 pelvic lesions collected through videolaparoscopy. Among the results obtained, the mean age of participants was 33.5 years. The rectovaginal septum was the most frequent lesion site (66.7%) and dysmenorrhea was the most commonly reported symptom. The average methylation levels were  $42.98\% \pm 5.38\%$  for H19DMR and  $58.79\% \pm 4.74\%$  for KvDMR1. No statistically significant differences in methylation or lncRNA expression were observed across disease classifications. However, three cases of hypomethylation in H19DMR and two cases of hypermethylation in KvDMR1 were identified in infiltrative lesions. Additionally, a predominance of the heterozygous pattern was observed in the rs2107425 (C/T = 53.3%) and rs2071094 (G/T = 66.6%) regions. Notably, a significant association was found between *H19* expression and family history of endometriosis ( $p = 0.0469$ ), along with a negative correlation between *H19* expression and BMI ( $p = 0.035$ ,  $r = -0.498$ ). These findings underscore the importance of further investigating epigenetic mechanisms in endometriosis, as they may contribute to disease progression and its clinical heterogeneity.

**Keywords:** Endometriosis, methylation, genomic *imprinting*, lncRNA.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Patogênese multifatorial da endometriose .....	24
Figura 2 - Mecanismos de ação da regulação gênica dos lncRNAs .....	29
Figura 3 - Processo de metilação e desmetilação do DNA .....	30
Figura 4 - Regiões controladoras de <i>imprinting</i> (ICRs) do cromossomo 11 humano e alguns genes desses clusters .....	34
Figura 5 - Possível mecanismo epigenético da participação do <i>imprinting</i> genômico e dos lncRNAs <i>H19</i> e <i>KCNQ1OT1</i> na endometriose.....	36
Figura 6 - Sequência genômica das DMRs com o alinhamento dos iniciadores .....	43
Figura 7- Análise dos fragmentos dos pools das bibliotecas de amostras preparadas para sequenciamento de nova geração para H19DMR e KvDMR1 .....	44
Figura 8 - Padrão de metilação da H19DMR entre os grupos estudados .....	56
Figura 9 - Percentual de leituras metiladas na região H19DMR em diferentes lesões proveniente de pacientes com endometriose.....	58
Figura 10 - Padrão de metilação da KvDMR1 entre os grupos estudados.....	61
Figura 11 - Percentual de leituras metiladas na região KvDMR1 em diferentes lesões proveniente de pacientes com endometriose.....	62
Figura 12 - Níveis de metilação das ICRs em relação aos locais de coleta: septoretovaginal, fossa ovariana e bexiga .....	63
Figura 13 - Comparação de reads metiladas da H19DMR e a utilização de medicamentos hormonais .....	64
Figura 14 - Expressão de <i>H19</i> e <i>KCNQ1OT1</i> nos grupos de endometriose superficial e endometrioma/infiltrativa .....	65
Figura 15 - Curva de correlação entre o índice de massa corporal (IMC) e a expressão de <i>H19</i> .....	66
Figura 16 - Relação entre expressão de <i>H19</i> e a existência de casos de endometriose na família .....	67
Figura 17 - Dotplot da quantificação absoluta obtida por partição na dPCR dos genes <i>KCNQ1OT1</i> e <i>CDKN1C</i> na amostra S18 .....	69

Figura 18 - Dotplot da quantificação absoluta obtida por partição na dPCR dos genes <i>H19</i> e <i>IGF2</i> na amostra S19.....	69
Figura 19 - Nível de expressão dos genes DNMTs, <i>IGF2</i> e <i>CDKN1C</i> em tecido endometrial normal obtido pelo consenso de dados normalizados provenientes do Human Protein Atlas (HPA) e Genotype-Tissue Expression (GTex).....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das sequências dos primers usados na reação de PCR para as regiões H19DMR e KvDMR1.....	41
Tabela 2 - Descrição das sondas utilizadas na reação de qPCR para a expressão gênica das regiões H19DMR e KvDMR1 .....	46
Tabela 3 - Descrição das sondas utilizadas na reação de dPCR para quantificação absoluta das regiões H19DMR e KvDMR1 .....	47
Tabela 4 - Caracterização sociodemográfica e das variáveis clínicas das pacientes com endometriose.....	50
Tabela 5 -Metilação da H19DMR distribuídas por classificação do local de lesão .....	53
Tabela 6 - Distribuição da frequência genotípica e alélica dos Polimorfismos de Base Única (SNPs): rs2107425 e rs207109 nas amostras analisadas .....	57
Tabela 7 - Metilação da KvDMR distribuídas por classificação do local de lesão .....	59
Tabela 8 - Correlação entre variáveis clínicas e a metilação da H19DMR e KvDMR1 .....	63
Tabela 9 - Correlação entre variáveis clínicas e a expressão dos lncRNA <i>H19</i> e <i>KCNQ1OT1</i> .....	67
Tabela 10 - Quantificação absoluta dos genes obtidas por PCR digital nas amostras analisadas .....	68
Tabela 11 - Distribuição da frequência genotípica e alélica da população latino-americana dos Polimorfismos de Base Única (SNPs): rs2107425 e rs207109 disponível no banco de dados Ensembl.....	71
Tabela 12 - Mutações do gene <i>H19</i> descritas no cBioPortal com os dados do TCGA Pan-Cancer Atlas .....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5caC	5-carboxilcitosina
5fC	5-formilcitosina
5mC	5-metilcitosina
5hmC	5-hidroximetilcitosina
AINES	Antiinflamatórios não-esteroidais
ASRM	Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva
<i>ARID1A</i>	Gene regulador da cromatina e supressor tumoral
CA-125	Antígeno Carboidrato 125
CCL	Ligante de quimiocina motivo CC
CD36	Cluster de Diferenciação 36
<i>CDKN1C</i>	Gene do inibidor de quinase dependente de ciclina 1c
<i>CDKN2B-AS1</i>	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2B Antisense RNA 1</i>
COX-2	Enzima ciclooxygenase 2
CTCF	Fator de ligação CCCTC
CpG	Dinucleotídeo citosina-guanina
DMR	Região diferencialmente metilada
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferase
dPCR	PCR digital
<i>ESR1</i>	Gene do receptor alfa de estrogênio
<i>ESR2</i>	Gene do receptor beta de estrogênio
<i>GREB1</i>	<i>Growth Regulation by Estrogen in Breast Cancer 1</i>
<i>H19</i>	H19 Imprinted Maternally Expressed Transcript

HDAC	Histona desacetilase
ICR	Região controladora de <i>imprinting</i>
<i>IGF2</i>	<i>Insulin-like growth factor 2</i>
IL	Interleucina
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral
<i>KCNQ1</i>	Gene do canal de potássio dependente de voltagem
<i>KCNQ1OT1</i>	Transcrito 1 sobreposto do <i>KCNQ1</i>
<i>KRAS</i>	Gene da família RAS
let-7b	microRNA da família let-7
lncRNA	RNA longo não codificante
M1–M2	Fenótipos de macrófagos (pró e anti-inflamatórios)
miRNAs	MicroRNAs
miR-122	microRNA 122
miR-199a	microRNA 199a
miR-451	microRNA 451
ncRNA	RNA não codificante
NK	Células natural killer
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real após transcrição reversa
SAM	S-adenosil-L-metionina
SNP	Polimorfismo de base única
SUS	Sistema Único de Saúde
PGE2	Prostaglandina E2
<i>PGR</i>	Gene do receptor de progesterona

<i>PIK3CA</i>	Gene da subunidade catalítica alfa da PI3K
PR-A	Isoforma A do receptor de progesterona
PR-B	Isoforma B do receptor de progesterona
TET	Enzima <i>ten–eleven translocation</i>
Th	Linfócito T auxiliar
VEGF	Fator de crescimento endotelial
<i>VETZ</i>	Gene que codifica uma proteína reguladora da via Wnt
<i>WNT4</i>	Gene da via Wnt

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
<b>1.1 Endometriose</b> .....	19
<b>1.2 Epigenética</b> .....	27
<b>1.3 <i>Imprinting</i> genômico - regiões H19DMR e KvDMR1</b> .....	32
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	37
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	37
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	37
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
<b>3.1 CASUÍSTICA E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....	38
3.1.1 <i>Critérios de inclusão</i> .....	38
3.1.2 <i>Critérios de exclusão</i> .....	38
<b>3.2 COLETA DE AMOSTRAS</b> .....	39
<b>3.3 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS</b> .....	39
<b>3.4 PADRÃO DE METILAÇÃO POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO</b> 40	
3.4.1 <i>Conversão do DNA por Bissulfito de Sódio</i> .....	40
3.4.2 <i>Preparação das bibliotecas e Sequenciamento de Nova Geração</i> .....	41
3.4.3 <i>Análises de bioinformática</i> .....	45
<b>3.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR</b> .....	45
3.5.1 <i>Síntese do cDNA</i> .....	45
3.5.2 <i>PCR em tempo real</i> .....	46
<b>3.6 QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA POR PCR DIGITAL (dPCR)</b> .....	47
<b>3.7. PESQUISA EM BANCO DE DADOS PÚBLICOS</b> .....	47
<b>3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	48
<b>4. RESULTADOS</b> .....	49
<b>4.1. Caracterização dos pacientes</b> .....	49
<b>4.2. Análise do sequenciamento pós-modificação com bissulfito de sódio (Bis-seq)</b> .....	53
<b>4.3. Análise da expressão gênica</b> .....	64
<b>4.4 Quantificação absoluta por dPCR</b> .....	68
<b>4.5 PESQUISA EM BANCO DE DADOS PÚBLICOS</b> .....	70
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	72
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	80
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81
<b>APÊNDICE A – Padrão de metilação da H19DMR e KvDMR1 dividido por coletas em pacientes participantes do estudo</b> .....	92

<b>APÊNDICE B – COMPILAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR PACIENTE ...</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) .....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA .....</b>	<b>98</b>

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Endometriose

A endometriose é uma doença crônica inflamatória, dependente de estrogênio e caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina (CHAPRON et al., 2019; WANG et al., 2022). Foi primeiramente descrita em 1860 por Karl von Rokitansky e, anteriormente considerada uma doença exclusivamente ginecológica, é proposto descrevê-la como uma enfermidade multifatorial que afeta todo o organismo (GIUDICE e KAO, 2004; TAYLOR et al., 2021).

Os implantes endometriais podem ser encontrados nos ovários, bexiga, septo retovaginal e em regiões mais distantes da pelve, como cérebro, pleura e medula espinhal (GIUDICE e KAO, 2004; PATEL et al., 2018). As manifestações clínicas são bem diversas, variando entre casos assintomáticos a dor pélvica crônica, dispareunia, dismenorreia, problemas intestinais (diarreia ou constipação), disúria, fadiga e infertilidade (PARASAR et al., 2017; ZONDERVAN et al., 2020). Além disso, acredita-se que a endometriose esteja associada ao alto risco de desenvolvimento de outras enfermidades, como infecções vaginais, doenças autoimunes e câncer, especialmente o ovariano (KONINCKX et al., 2019; ZONDERVAN et al., 2020).

A endometriose afeta negativamente a realização das atividades cotidianas, reduzindo a qualidade de vida das mulheres afetadas. A doença está relacionada com danos psicológicos, como depressão e ansiedade (em mais de 50% dos casos), e com prejuízos financeiros, os quais ultrapassam 20 bilhões de dólares nos Estados Unidos, por despesas de saúde para realização de exames, hospitalizações e cirurgias, além da diminuição de produtividade no trabalho em função dos sintomas clínicos, como a dor crônica (AHN et al., 2017; CHAPRON et al., 2019; MISSMER et al., 2022).

A ausência de bons ensaios sobre a prevalência, a variação de informações entre as diferentes populações mundiais, a existência de casos assintomáticos e a demora de se concluir o diagnóstico impactam na obtenção de dados epidemiológicos exatos, mas acredita-se que a endometriose afeta

mundialmente em torno de 10% das mulheres em idade fértil, correspondendo a 190 milhões de casos (HORNE e MISSMER, 2022; WHO, 2023). No Brasil, em 2021, foram realizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) mais de 26 mil atendimentos e, em 2023, mais de 115 mil atendimentos na atenção primária relacionados ao diagnóstico da endometriose (BRASIL, 2022; BRASIL, 2025).

Os fenótipos mais reconhecidos da doença são: lesões superficiais peritoneais, endometriomas ovarianos e endometriose infiltrativa profunda. Também, há ocorrência de lesões extra pélvicas (ZONDERVAN et al., 2020). A endometriose infiltrativa é considerada a forma mais grave, com nódulos que possuem mais de 5 mm de profundidade de invasão tecidual e estão distribuídos em vários locais do corpo (CHAPRON et al., 2019; TAYLOR et al., 2021).

Apesar da existência de diferentes sistemas de classificação para a doença, a endometriose não possui uma categorização completamente adequada, principalmente em decorrência da sua apresentação heterogênea (LEE et al., 2021). A classificação da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM, do inglês *American Society for Reproductive Medicine*) revisada em 1997 (rASMR) é a mais utilizada mundialmente (TAYLOR et al., 2021). Atribui-se uma pontuação aos implantes endometriais, levando em consideração o tamanho, a localização e a severidade, sendo a doença dividida em quatro estágios: mínimo (1 - 5 pontos), leve (6 - 15 pontos), moderado (16 - 40 pontos) e grave (mais de 40 pontos) (ASRM, 1997; CAPEZZUOLI, 2020).

A classificação revisada da ASMR apresenta como principais desvantagens a baixa reprodutibilidade bem como pouca correlação com a endometriose profunda, a infertilidade, a dor e o prognóstico (HORNE e MISSMER, 2022). Em 2005, foi proposta a criação de um outro sistema de classificação complementar: Enzian. Revisada em 2010 e 2011, a Enzian divide as infiltrações em três compartimentos: A (vagina e septo retovaginal), B (ligamento uterossacro e parede pélvica) e C (reto e cólon sigmoide) com três graus de invasividade: 1 (menor de 1 cm), 2 (entre 1 e 3 cm) e 3 (maior que 3 cm). Além disso, inclui a letra F para denominar lesões em outros órgãos ou locais distantes da região pélvica (HAAS et al., 2013; LEE et al., 2021).

Pela ausência de um consenso no sistema de classificação da doença, a Sociedade Mundial de Endometriose sugeriu, em 2014, fazer uso dos sistemas rASMR e Enzian em conjunto com o Índice de Endometriose e Fertilidade

desenvolvido em 2010, o qual utiliza alguns dados clínicos, tais como idade, gravidez prévia, anos de infertilidade e a pontuação da classificação rASMR para estimar uma taxa de perspectiva de gravidez nas pacientes (FRANÇA et al., 2022; LEE et al., 2021).

O diagnóstico da endometriose é complexo e lento, principalmente atrelado a diversidade de apresentação clínica da doença e a necessidade de uma confirmação visual dos infiltrados endometriais. Estima-se que a cada 10 pacientes, seis são diagnosticadas erroneamente (WANG et al., 2022), impactando no processo para concluir o diagnóstico, o qual ocorre em torno de quatro a 11 anos (CHAPRON et al, 2019; TAYLOR et al., 2021).

A anamnese detalhada, com foco nos sintomas mais comuns da doença, combinada com o exame físico, por meio da inspeção da pelve com espéculo e/ou palpação abdominal, passaram a ter papéis primordiais para estabelecer o diagnóstico clínico da endometriose. Entretanto, a principal limitação está relacionada à baixa acurácia do método, de acordo com os sintomas descritos e com a localização anatômica das lesões (PASCOAL et al., 2022). Ferramentas de imagem, como a ultrassonografia transvaginal e a ressonância magnética, aparecem como possíveis auxiliares não invasivos, mas com diferentes sensibilidade e especificidade para os fenótipos da doença. Por exemplo, em estudo de revisão realizada em 2016, Nisenblat e colaboradores observaram que a sensibilidade e especificidade dessas técnicas foram superiores para detecção de endometrioma ovariano (maiores que 90%) do que para diagnóstico de endometriose infiltrativa profunda (NISENBLAT et al., 2016).

A laparoscopia é considerada o padrão ouro pelas diretrizes clínicas de sociedades profissionais, permitindo a inspeção direta da cavidade pélvica. Entretanto, a sua principal aplicação destina-se ao tratamento cirúrgico, por meio da excisão dos implantes endometriais. O resultado histológico das biópsias obtidas durante o procedimento cirúrgico é utilizado como confirmação do resultado. Porém, por se tratar de um procedimento invasivo e possuir custo alto, a laparoscopia necessita ser realizada por profissional habilitado e é uma metodologia cuja aceitação pelas pacientes geralmente não é alta (AHN et al., 2017; ROLLA, 2019).

Para controle das dores pélvicas crônicas características da endometriose, recomenda-se uso de antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) e

analgésicos. Os AINES agem na enzima cicloxigenase, impedindo a formação de prostaglandinas, cuja função está intimamente relacionada com os processos de inflamação e sensibilidade à dor (TAYLOR et al., 2021). Por ser uma doença dependente de estrogênio, os tratamentos farmacológicos buscam criar um ambiente de supressão de estradiol. Para tal, a primeira linha de escolha é baseada na utilização de pílulas anticoncepcionais com progestagênio ou combinadas (TAYLOR et al., 2021; ZONDERVAN et al., 2020). A opção farmacológica de segunda linha são medicamentos que atuam no receptor do hormônio liberador de gonadotrofina (agonistas ou antagonistas), os quais estimulam um feedback negativo hipotalâmico na produção de estradiol pelos ovários (PATEL et al., 2018). Por fim, ainda pode ser utilizado como opções os medicamentos andrógenos, como o danazol, ou inibidores da enzima aromatase, responsável pela biossíntese de estrogênio (FRANÇA et al., 2022).

Devido aos efeitos colaterais das terapias hormonais, tais como perda óssea, ondas de calor e redução de libido, similares aos sintomas da menopausa, há uma limitação máxima de tempo de sua utilização ou necessidade de reposição com doses baixas de estradiol (PATEL et al., 2018; ZONDERVAN et al., 2020). Além disso, os tratamentos com hormônios impossibilitam as mulheres com endometriose de conseguir engravidar, sendo uma grande desvantagem desse tipo de método (ANH et al., 2017). Nesse sentido, o tratamento cirúrgico aparece como uma possibilidade única ou combinada com uso farmacológico. As cirurgias são recomendadas principalmente nos casos de endometriomas ovarianos e endometriose profunda. As cirurgias conservativas realizam a remoção parcial ou total das lesões endometrióticas, enquanto as definitivas, além da remoção de todas as lesões efetuam a retirada do útero e/ou ovários das pacientes (CHAPRON et al., 2019; HORNE e MISSMER, 2022).

A origem da endometriose não é totalmente esclarecida e as diferentes vertentes que buscam explicar seu desenvolvimento podem ser enquadradas em: implantação direta, implantação indireta, teorias de base genética/epigenética e transformação *in situ* (WANG et al., 2022). A teoria da menstruação retrógrada (SAMPSON, 1927), proposta por Sampson no final de 1920, é amplamente aceita (CHAPRON et al., 2019). Algumas células endometriais descamadas durante a menstruação percorrem o sentido contrário

em direção à cavidade pélvica, auxiliadas por movimentos peristálticos das tubas uterinas. Dessa forma, as células endometriais viáveis podem se desenvolver nos tecidos da cavidade pélvica, com formação de novos vasos sanguíneos, fornecimento de citocinas e fatores de crescimento (GIUDICE e KAO, 2004). Por ser uma condição comum em 76-90% das mulheres saudáveis, a menstruação retrógrada esclarece o desenvolvimento da endometriose em somente uma parcela das mulheres em idade fértil (SYMONS et al., 2018).

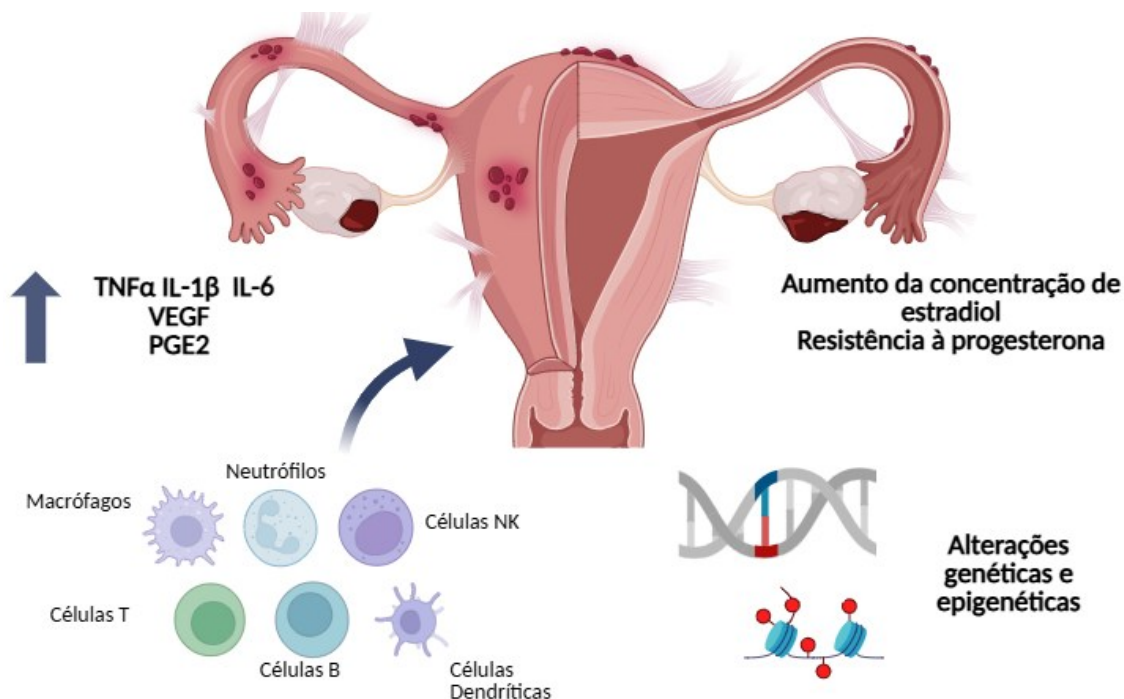
A teoria da metaplasia celômica sugere que a doença tem origem através do epitélio celômico remanescente da diferenciação para formação do sistema reprodutor feminino. Dessa forma, de acordo com o estímulo recebido, as células celômicas indiferenciadas sofrem metaplasia em tecido endometrial ativo (KONRAD et al., 2019). Esta teoria auxilia a entender a origem dos casos de endometrioma ovariano, pois o tecido que recobre os ovários tem origem do epitélio celômico, e dos casos de endometriose em pacientes do sexo masculino e em mulheres histerectomizadas (LAMCEVA et al., 2023). Ainda na esfera metaplásica, a teoria embriogênica postula que um defeito durante o desenvolvimento do embrião resulte em uma disseminação e proliferação errônea de células remanescentes müllerianas, as quais permanecem dormentes até a puberdade e se diferenciariam após estímulo do estrogênio (LAMCEVA et al., 2023; SIGNORILE et al., 2022).

A incapacidade de explicar invasões que acometem tecidos distantes da região pélvica impulsionou o surgimento da teoria da disseminação via circulação hematológica e linfática. Células endometriais viáveis podem ser transportadas nos vasos sanguíneos e linfáticos e metastizar-se em diferentes regiões do organismo (ZONDERVAN et al., 2020; WANG et al., 2022).

Apesar da existência de diferentes teorias para a origem da endometriose, considera-se que a doença seja multifatorial, não havendo um único motivo isolado responsável (Figura 1). O ambiente, o estilo de vida, condições imunológicas, endócrinas, genéticas e epigenéticas atuam em conjunto, interagindo entre si (CHAPRON et al., 2019; ZONDERVAN et al., 2020). Como possíveis fatores de risco para o desenvolvimento da doença, são descritos o consumo em excesso de bebidas alcoólicas, carne vermelha e gorduras trans, além de aspectos biológicos, como duração reduzida do ciclo menstrual,

menarca precoce, fluxo menstrual intenso e baixo índice de massa corporal (PATEL et al., 2018; SHAFRIR et al., 2018).

Figura 1- Patogênese multifatorial da endometriose



Fonte: Própria autora utilizando a ferramenta BioRender.com. A figura ilustra os principais mecanismos envolvidos na patogênese da endometriose. Os macrófagos, neutrófilos, as células NK, células T, células B e células dendríticas, desempenham papéis importantes na resposta inflamatória. O aumento de citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, VEGF e PGE2, contribui para a inflamação crônica e o desenvolvimento de lesões endometrióticas. Além disso, o aumento de estradiol e resistência à progesterona, assim como as modificações genéticas e epigenéticas, contribuem para a persistência e progressão da doença.

A desregulação imunológica que ocorre na endometriose é caracterizada pela deficiência da resposta mediada pelas células e criação de um microambiente incapaz de combater adequadamente os implantes endometriais, de maneira similar ao apresentado em tumores cancerígenos (DMOWSKI e BRAUN, 2004; GIUDICE e KAO, 2004). Entretanto, ainda são necessários maiores esclarecimentos se a desregulação do sistema imune é o fator responsável pelo início da patogênese da doença ou uma resposta secundária (SYMONS et al., 2018).

O recrutamento de células imunes ocorre por meio da liberação de quimiocinas, tais como o ligante de quimiocina motivo CC 2 (CCL2), ligante de quimiocina motivo CC 5 (CCL-5), ligante de quimiocina motivo CC 11 (CCL-11)

e interleucina 8 (IL-8) (BORRELLI et al., 2013). Os macrófagos são as células imunes de maior predomínio no líquido peritoneal das pacientes afetadas, apresentando uma baixa capacidade fagocítica, pela diminuição da expressão do receptor CD36, além de uma alta secreção das citocinas pró inflamatórias: fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6). Sabe-se que existe uma mudança na polarização M1-M2 na endometriose, mas ainda não está bem definido para qual fenótipo e a sua exata contribuição na patogênese da doença (PATEL et al., 2018; SYMONS et al., 2018). Além disso, os macrófagos apresentam maior expressão da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) e maior produção de prostaglandina E2 (PGE2), a qual está diretamente relacionada com a dor (BURNEY e GIUDICE, 2012).

As células *natural killer* (NK) apresentam atividade citotóxica reduzida, pois a IL-6 liberada no meio altera a composição citolítica de seus grânulos. Também, há um aumento na expressão de receptores de inibição para células NK na superfície das células endometriais de mulheres afetadas com a doença, bloqueando a morte ativada por essas células de defesa (DMOWSKI e BRAUN, 2004; SYMONS et al., 2018). Os neutrófilos costumam atingir um pico de concentração no local afetado durante o início do processo inflamatório atraídos pela IL-8 e apresentam um importante papel na angiogênese ao liberar o fator de crescimento endotelial (VEGF) (SYMONS et al., 2018; WANG et al., 2023). A participação das células dendríticas, células B e células T ainda necessita maiores investigações. Essas células imunes são importantes na manutenção de um ambiente inflamatório e angiogênico pela liberação de autoanticorpos e citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6. A presença de citocinas pró inflamatórias sugere uma participação de células com fenótipo Th2, mas a resposta imune aparenta ser predominantemente celular, havendo participação de células T regulatórias e Th17 no peritônio, com altos níveis de IL-17 (SYMONS et al., 2018; WANG et al., 2023).

A endometriose também é caracterizada por um desequilíbrio hormonal. Ocorre um aumento na concentração local de estradiol disponível e expressão diferenciada dos receptores  $\alpha$  e  $\beta$  de estrogênio, estimulando a proliferação celular, a inibição da apoptose, a angiogênese e a inflamação (BULUN et al., 2019). Além disso, há uma considerável resistência à progesterona por meio da redução da expressão das isoformas (PR-A e PR-B) do seu receptor celular

(BURNEY e GIUDICE, 2012; LAMCEVA et al., 2023). A progesterona é responsável por inibir a proliferação de células endometriais, estimulando a decidualização do tecido endometrial e redução das lesões, enquanto o estradiol é responsável pelo aumento da produção de PGE2 (KONINCKX et al., 2018; TAYLOR et al., 2021). A alteração na expressão de receptores hormonais afeta o sistema de retroalimentação do sistema endócrino, aumentando a discrepância entre os níveis de estrogênio e progesterona em pacientes com endometriose (PATEL et al., 2018).

As desregulações imunológicas e hormonais da endometriose são influenciadas pelas alterações genéticas e epigenéticas ocorridas previamente. De acordo com o conceito de redundância dos processos celulares, é necessário que ocorra um efeito cumulativo dessas alterações para que a capacidade de compensação do sistema seja ultrapassada, permitindo, assim, a manifestação clínica da doença (DMOWSKI e BRAUN, 2004; KONINCKX et al., 2019). Estudos anteriores demonstram que na endometriose ocorre a participação de componentes genéticos, os quais podem ser transmitidos hereditariamente e aumentar em mais de duas vezes as chances de desenvolver a doença em parentes de primeiro grau, por exemplo filhas ou irmãs, de mulheres diagnosticadas (GIUDICE e KAO, 2004; TAYLOR et al., 2021).

Estudos de associação do genoma inteiro (GWAS, do inglês *Genome-Wide Association Studies*) identificaram alguns genes e polimorfismos de base única (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) significativamente associados à endometriose, como enzimas envolvidas na síntese e regulação de estrogênio (aromatase, 17- $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase e *GREB1*), receptores celulares de hormônios (*ESR1*, *ESR2*, *PGR*), fatores de crescimento (*VEGFA*) e componentes de adesão celular (*VETZ*), supressores tumorais (*CDKN2B-AS1* e *ARID1A*), oncogenes (*PIK3CA* e *KRAS*) e desenvolvimento uterino (*WNT4*) (AHN et al., 2017; GIUDICE e KAO, 2004; BULUN et al., 2019; FRANÇA et al., 2022).

Não existe um biomarcador para diagnóstico da endometriose, mas diversos alvos no sangue, urina e tecidos vem sendo estudados (FASSBENDER et al., 2015). Já foi demonstrado que o marcador tumoral CA-125 apresenta aumento dos níveis sanguíneos durante a menstruação em mulheres com endometriose com 93% de sensibilidade e 92% de especificidade (KAFALI et al.,

2004). Alguns estudos identificaram microRNAs (miRNAs) diferencialmente expressos em mulheres com endometriose quando comparados com mulheres sem a doença, sugerindo uma possível assinatura de miRNAs circulantes, por exemplo: let-7b, miR-122, miR-199a, miR-451 (AHN et al., 2017; SOTO et al., 2022; TAYLOR et al, 2021). Entretanto, os biomarcadores não possuem uso na rotina clínica principalmente devido à inespecificidade para endometriose (HORNE e MISSMER, 2022).

## 1.2 Epigenética

O conceito de epigenética foi definido pela primeira vez pelo biólogo britânico Conrad H. Waddington em 1942, durante seus ensaios sobre embriologia, como o estudo dos mecanismos causais da interação entre os genes, seus produtos e o fenótipo. Atualmente, a epigenética se refere ao estudo das alterações reversíveis na expressão gênica causadas por outros meios que não a mudanças de bases nitrogenadas na sequência do DNA, mas que são mantidas durante as divisões celulares (mitose e meiose) e, em alguns casos, transmitidas à descendência (HAIG, 2004; JABLONKA e LAMM, 2012; MORANGE, 2013).

Os principais mecanismos epigenéticos descritos são: metilação do DNA, modificações de histonas e RNAs não codificadores (ncRNAs). Apesar de serem independentes, os mecanismos epigenéticos trabalham em uma complexa rede de interação, sendo fundamentais na regulação, manutenção e mudanças na expressão gênica dos vários processos celulares, como metabolismo, desenvolvimento e diferenciação celular (FESSELE E WRIGHT, 2018; INBAR-FEIGENBERG et al., 2013).

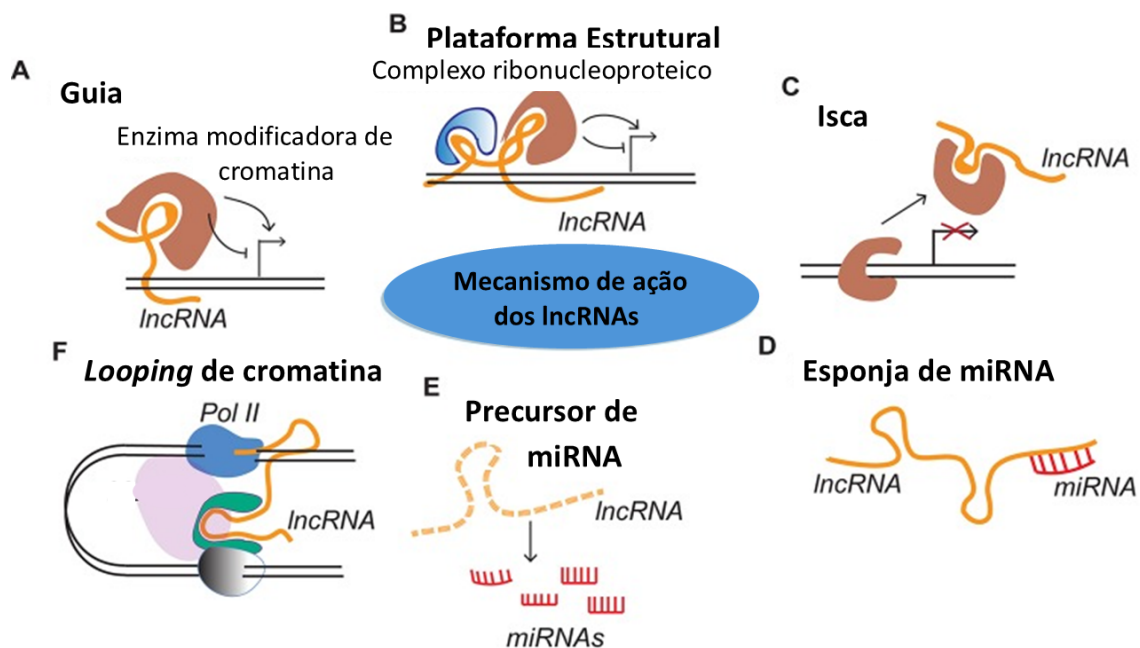
As modificações de histonas são alterações pós-traducionais, como fosforilação, ubiquitinação, metilação e acetilação em aminoácidos específicos na cauda das histonas (H2A, H2B, H3 e H4) que compõe o octâmero do nucleossomo. A adição e remoção de grupamentos nas histonas são cumulativas e são realizadas por diferentes enzimas, alterando a acessibilidade do complexo de transcrição a determinadas porções do DNA. Por exemplo, a acetilação de resíduos de lisina pela Histona acetiltransferase resulta em descondensação da cromatina e ativação da transcrição. Existe uma grande

possibilidade de combinações de modificações sequenciais nas histonas, sendo o conjunto delas conhecido como “código de histonas” (MAJUMDAR et al., 2017; van LEEUWEN e van STEENSEL, 2005).

Os ncRNAs compreendem os transcritos funcionais que não codificam para proteínas (PRASANTH e SPECTOR, 2007). Os ncRNA desempenham papel regulatório e estão envolvidos no controle da expressão gênica a nível transcricional e pós-transcricional (MATTICK e MAKUNIN, 2006; PEREIRA, 2017). Os miRNAs, classe mais estudada de ncRNA, possuem em média 22 nucleotídeos de comprimento, agindo por meio da inibição da tradução e, mais comumente, por meio da desestabilização do RNA mensageiro (RNAm) (BHASKARAN e MOHAN, 2014; SALIMINEJAD et al., 2019).

Os RNAs longos não codificantes (lncRNA) são moléculas com mais de 200 nucleotídeos, relacionados à inativação gênica por meio de complexos RNA-proteína, RNA-DNA e RNA-RNA que atuam na modulação da cromatina (KONDO et al., 2017; SIENA e BARROS, 2017). A regulação gênica mediada por lncRNAs pode ocorrer tanto em genes vizinhos (ação em *cis*) quanto em genes distantes (ação em *trans*), por meio de diferentes mecanismos: organização da cromatina - atuando como guias de enzimas modificadoras ou modulando a compactação tridimensional da cromatina; interferência na disponibilidade de miRNAs - funcionando como precursores ou esponjas; e controle da transcrição gênica - servindo como moldes estruturais para a montagem de complexos proteicos ou como isca que sequestra enzimas reguladoras (Figura 2) (STATELLO et al., 2021; SWETA et al., 2019).

Figura 2 - Mecanismos de ação da regulação gênica dos lncRNAs

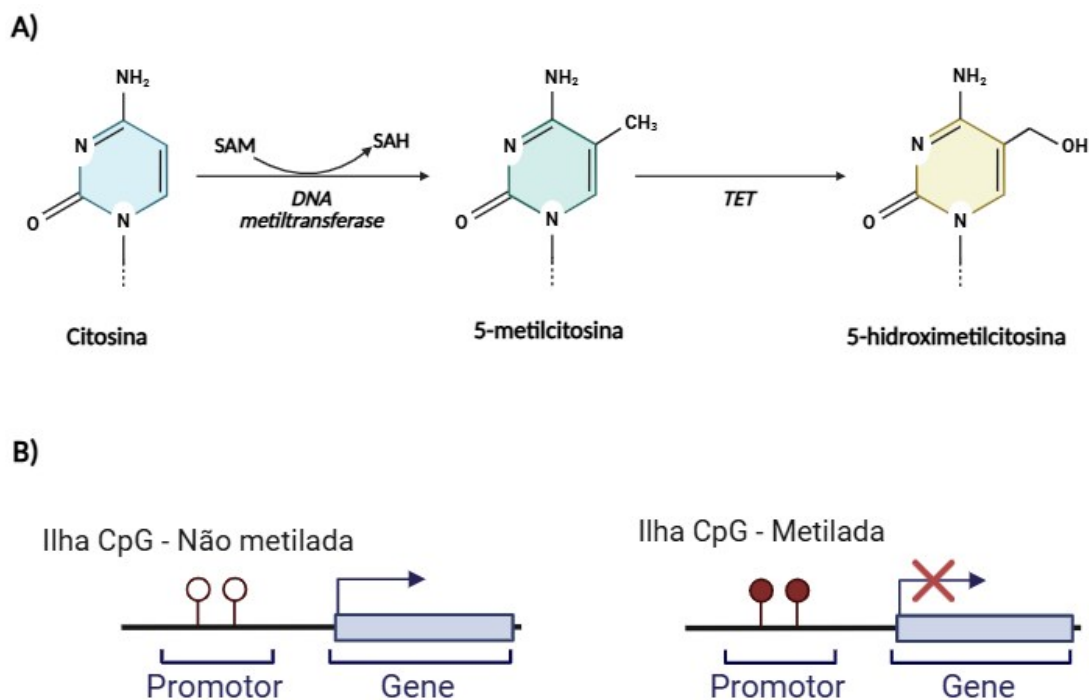


Fonte: Adaptado de SWETA et al., 2019.

A metilação do DNA é o processo reversível de adição covalente do grupamento metil (-CH<sub>3</sub>) no carbono cinco do anel pirimidínico da base citosina, convertendo-a em 5-metilcitosina (5mC), catalisada por uma família de enzimas chamadas de DNA metiltransferases (DNMTs), que utilizam como cofator a molécula de S-adenosil-L-metionina (SAM) (Figura 3a) (MOORE et al., 2013; FESSELE e WRIGHT, 2018). As três enzimas principais são DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. A DNMT1 é descrita como responsável pela metilação preferencial de citosina hemimetiladas após a replicação semiconservativa do DNA, de maneira a manter os padrões pré-existentes da fita mãe, enquanto as DNMT3a e 3b catalisam as reações de metilação *de novo* do DNA, ou seja, introduzem metilação em regiões com citosinas não-metiladas anteriormente (KLOSE e BIRD, 2006; MORGAN et al., 2018). A desmetilação do DNA acontece por meio de um conjunto de reações catalisadas por enzimas chamadas de TETs (do inglês *ten-eleven translocation*) - TET1, TET2 e TET3 (Figura 2a). Primeiramente, há a adição do grupamento hidroxila (-OH) à 5mC, transformando-a em 5-hidroximetilcitosina (5hmC) com posterior oxidação para 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxilcitosina (5caC) (MOORE et al., 2013; WU e ZHANG, 2017).

O processo de metilação da citosina ocorre em regiões de dinucleotídeo citosina-guanina (CpG), as quais compreendem aproximadamente 30 milhões de sítios com possibilidade de metilação no genoma humano. As maiores concentrações de CpG a serem metiladas estão próximas a regiões promotoras de transcrição, as chamadas de ilhas CpG, possuindo em torno de 200 pb de comprimento (INBAR-FEIGENBERG et al., 2013; EDWARDS et al., 2017). Desse modo, a metilação do DNA está intimamente relacionada com a regulação gênica, no passo que regiões CpG metiladas acarretam na compactação da cromatina (heterocromatina) e na supressão gênica por bloqueio ao acesso da maquinaria de transcrição (Figura 3b) (ANGELONI e BOGDANOVIC, 2019; MATTEI et al., 2022).

Figura 3 - Processo de metilação e desmetilação do DNA



Fonte: Própria autora utilizando a ferramenta BioRender.com. (A) Representação do processo químico de metilação do DNA, onde a citosina é convertida em 5-metilcitosina pela ação da enzima DNA metiltransferase (DNMT), utilizando SAM (S-adenosilmetionina) como doador de grupo metil. Subsequentemente, a 5-metilcitosina pode ser oxidada em 5-hidroximetilcitosina pela ação das enzimas TET (ten-eleven translocation). (B) A metilação de ilhas CpG em regiões promotoras está associada ao silenciamento da expressão gênica, enquanto a ausência de metilação permite a ativação da transcrição do gene.

A reprogramação epigenética é um processo normal e fundamental que ocorre durante o desenvolvimento e diferenciação celular, permitindo que as

células com mesmo material genético, exerçam funções distintas no organismo. Dessa forma, a depender do padrão tecidual, determinadas regiões são metiladas enquanto outras se mantêm não-metiladas (REIK et al., 2001; JAENISCH e BIRD, 2003).

O endométrio é um tecido com constantes variações entre o crescimento e apoptose em função das distintas fases do ciclo menstrual. Entende-se, portanto, que há alterações na reprogramação das células endometriais como consequência dos diferentes estímulos hormonais a qual estão submetidas. Células indiferenciadas presentes na camada basal do endométrio são estimuladas pelo estradiol a se diferenciar em células maduras endometriais e se multiplicar, criando condições que permitam a implantação embrionária. Na ausência de fecundação do ovócito liberado, inicia-se o processo menstrual, caracterizado pela descamação endometrial, e sua subsequente regeneração (HOUSHDARAN et al., 2016; BULUN et al., 2019).

Já foi identificado o aumento de expressão de enzimas DNMTs, histona desacetilases (HDAC1 e HDAC2) e histona metiltransferases na endometriose, resultando em alterações no controle epigenético de genes fundamentais envolvidos na fisiopatologia da doença (LAMCEVA et al., 2023; van KAAM et al., 2011; WU et al., 2007). Estudo anterior comparou o padrão de metilação entre o tecido ovariano endometriótico com tecido endometrial de mulheres a doença, demonstrando mais de 5 mil ilhas CpGs diferencialmente metiladas, sendo a maioria delas hipermetiladas, incluindo genes já descritos com participação no desenvolvimento da endometriose (DYSON et al., 2014). Em 2016, a análise da metilação global do genoma demonstrou que mulheres afetadas com a doença apresentaram cerca de 61% dos sítios CpGs hipometilados. As diferenças entre os grupos controle e endometriose foram mais evidentes durante a fase secretória do ciclo menstrual, período em que as pacientes afetadas exibiram um número aumentado de loci com perda de metilação (HOUSHDARAN et al. 2016). A hipometilação global compromete o genoma e favorece a instabilidade gênica, exercendo um importante papel no desenvolvimento de diversas doenças, como câncer, doenças cardiovasculares, doenças neurológicas e de desenvolvimento (FARSETTI et al., 2023; MOOSAVI e ARDEKANI, 2016).

Alguns promotores de genes foram relatados com padrão de metilação alterado (hipometilação ou hipermetilação) na endometriose. Dentre os casos de

hipermetilação, já foram descritos o gene *GATA2*, fator de transcrição que regula a decidualização do endométrio (DYSON et al., 2014), e o gene *HOXA10*, o qual está envolvido com desenvolvimento do útero durante a embriogênese, com a diferenciação e proliferação celular no ciclo menstrual e com a implantação fetal no endométrio (GUO, 2009; ZANATTA et al., 2010). Na síntese de hormônios esteroidais, relata-se uma expressiva hipometilação do promotor gênico do *SF1*, fator responsável por aumentar a expressão local de enzimas esteroidogênicas, nas células endometrióticas quando comparado a células endometriais, assim como a ocorrência de modificações de histonas próximas ao gene da aromatase (*CYP19A1*), aumentando sua expressão (IZAWA et al., 2013; XUE et al., 2007; XUE et al., 2007). A resistência à progesterona também tem envolvimento epigenético, já que se relata uma hipermetilação do promotor do receptor PR-B e, conseqüentemente, uma diminuição na expressão. Também, menciona-se hipometilação do receptor  $\beta$  de estrogênio, com aumento da sua expressão no endométrio, promovendo a dependência deste hormônio na endometriose (GUO, 2009; PATEL et al., 2018).

A metilação do DNA é o principal mecanismo epigenético descrito, participando comumente nos processos de repressão transcricional de retrotransposons, compensação de dose pela inativação do cromossomo X em fêmeas e no *imprinting* genômico (INBAR-FEIGENBERG et al., 2013; MATTEI et al., 2022).

### **1.3 *Imprinting* genômico - regiões H19DMR e KvDMR1**

O *imprinting* genômico, termo utilizado primeiramente em 1960 pela citogeneticista Helen Crouse, é um fenômeno que ocorre em mamíferos placentários, no qual a expressão gênica é monoalélica dependendo da origem parenteral, isto é, somente um dos alelos do gene é transcrito dependendo especificamente de qual progenitor foi herdado, em desacordo com as leis mendelianas (BARLOW e BARTOLOMEI, 2014). Esse processo epigenético foi descoberto em estudos de fertilização de camundongos, nos quais embriões formados com duas cópias de DNA maternas ou duas cópias de DNA paternas se tornavam inviáveis. Assim, considerou-se que os genes sujeitos a esse

fenômeno são componentes genéticos indispensáveis, herdados de ambos os progenitores materno e paterno, que regulam o crescimento e desenvolvimento embrionário e extra-embrionário (BARLOW e BARTOLOMEI, 2014; TUCCI et al., 2019).

Os genes regulados por *imprinting* estão, na maioria das vezes, localizados em *clusters* nos cromossomos e sua atividade é regulada por regiões controladoras de *imprinting* (ICRs). A metilação do DNA é principal mecanismo epigenético envolvido com esse fenômeno, pois as ICRs são diferencialmente metiladas (DMR) de acordo com a origem parental, onde um alelo é silenciado enquanto o outro é expresso, mantendo o padrão parental de metilação após a fertilização (BARTOLOMEI et al., 2020; FERGUSON-SMITH e BOURC'HIS, 2018).

Sabe-se que o *imprinting* genômico está envolvido em pontos-chave do funcionamento fisiológico celular, tais como crescimento, viabilidade e homeostasia. Além disso, muitos dos genes que sofrem *imprinting* possuem expressão no cérebro, sendo relacionados com desenvolvimento do órgão e com comportamento humano. Já foram descritos aproximadamente 200 genes com transmissão monoalélica, distribuídos nos cromossomos 6, 7, 11, 14, 15 e 20 (INBAR-FEIGENBERG et al., 2013; TUCCI et al., 2019).

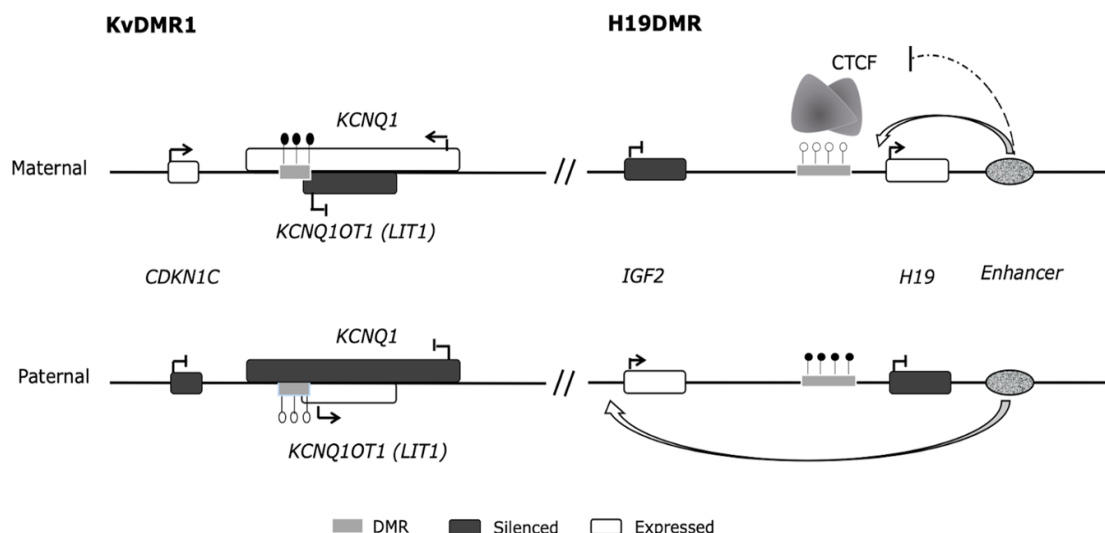
A perda de *imprinting* pode levar a ativação de genes que estariam silenciados em um alelo, por meio da alteração de metilação ou através da deleção de ICRs, ocasionando uma reprogramação epigenética errônea nas células ou superexpressão gênica e desencadeando doenças raras de desenvolvimento, como a Síndrome de Beckwith-Wiedemann, na qual há alteração na regulação epigenética no cromossomo 11p15 (WEKSBERG et al., 2010), além de doenças neurodegenerativas, por exemplo a Síndrome de Prader-Willi e neoplasias (INBAR-FEIGENBERG et al., 2013; FERGUSON-SMITH e BOURC'HIS, 2018; MIRANDA-FURTADO et al., 2019).

No cromossomo 11 existem duas ICRs caracterizadas: H19DMR (ICR1) e KvDMR1 (ICR2). A H19DMR está localizada na porção telomérica, na região 11p15.5 entre os dois genes controlados pela ICR1. No alelo paterno é preferencialmente metilado, restringindo o acesso da região pelo fator de transcrição CTCF. Assim, o gene *IGF2*, um fator de crescimento semelhante à insulina, consegue interagir com o *enhancer* e é codificado. Como no alelo

materno não há metilação, somente o gene *H19*, um lncRNA com propriedades de inibição de crescimento celular, é expresso (Figura 4) (STAMPONE et al., 2018; WEKSBERG et al., 2010).

A outra região controladora do cromossomo 11 (ICR2) se localiza na porção centromérica e controla o *imprinting* de um cluster de 800 kp de comprimento, com pelo menos oito genes, tais como *CDKN1C*, *KCNQ1OT1* ou *LIT1*, *KCNQ1*, *PHLDA2* e *SLC22A18*. A ICR2 fica no íntron 10 do gene *KCNQ1* e na região promotora do *LIT1/KCNQ1OT1*, o qual também é um lncRNA responsável pela regulação da expressão gênica de genes relacionados com crescimento e desenvolvimento celular. A metilação materna no gene *KCNQ1OT1* impede a expressão deste lncRNA, enquanto os genes *CDKN1C* - inibidor de quinase dependente de ciclina 1c ou p57, *KCNQ1* - um canal de potássio dependente de voltagem, *PHLDA2* e *SLC22A18* – proteínas com propriedades de supressão tumoral, são expressos. No alelo paterno, a ICR2 não está metilada, sendo paternalmente expresso o gene *KCNQ1OT1/LIT1*, enquanto os genes *CDKN1C*, *KCNQ1*, *PHLDA2* e *SLC22A18* são silenciados (Figura 4) (SCHULTZ et al., 2015; STAMPONE et al., 2018).

Figura 4 - Regiões controladoras de imprinting (ICRs) do cromossomo 11 humano e alguns genes desses clusters



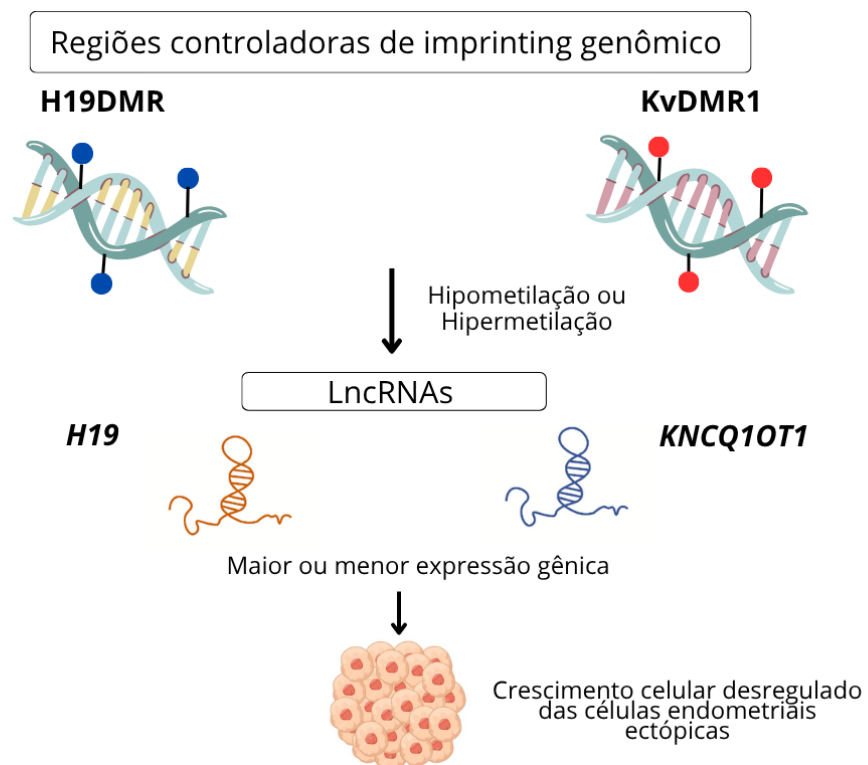
Fonte: Martinhago e Furtado, 2022. Representação dos mecanismos epigenéticos de *imprinting* genômico nas regiões KvDMR1 e H19DMR. Na KvDMR1, a cópia paterna é preferencialmente não metilada, permitindo a expressão de *KCNQ1OT1 (LIT1)* e silenciando os genes *CDKN1C* e *KCNQ1*. Na H19DMR, a não metilação na cópia materna permite a ligação da proteína CTCF, favorecendo a expressão de *H19* e impedindo a interação do enhancer com *IGF2*.

Por codificar genes envolvidos com o crescimento celular, a análise da metilação das ICRs do cromossomo 11 tem ganhado destaque como possível envolvimento na patogênese de diversas doenças complexas caracterizadas pelo descontrole da divisão, principalmente no câncer. O gene *H19*, por exemplo, é apontado como oncogene, com atuação através da ativação da autofagia e da invasão tecidual (GHAFOURI-FARD et al., 2020), assim como o *KCNQ1OT1* demonstra ter uma alta expressão em diversos tipos de células tumorais (CAGLE et al., 2021). Nosso grupo de pesquisa, por exemplo, encontrou uma correlação positiva na expressão do *H19* com apresentação clínica mais favorável na Síndrome Mielodisplásica (BORGES, 2022), além da possível participação da hipometilação da região H19DMR com o câncer peniano de células escamosas (SANTOS et al., 2024).

Na endometriose, especula-se que o endométrio das mulheres possua um alto grau proliferativo, o qual levaria ao desenvolvimento de lesões fora do endométrio. Estudos anteriores apontaram o possível envolvimento de genes regulados por regiões controladoras de *imprinting*, como o *CDKN1C* (QIAN et al., 2005), *IGF2* (JIN et al., 2022; KAMRANI et al., 2022) e *H19* (KAMRANI et al., 2022; SZAFLIK et al., 2022).

Dentre as alterações epigenéticas, os padrões de metilação do DNA e controle de *imprinting* genômico de determinadas regiões do genoma podem estar diretamente relacionados à perda ou ao ganho de função de genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular. Nesse contexto, alterações nos padrões de metilação das regiões controladoras de *imprinting* genômico localizadas no cromossomo 11, bem como mudanças na expressão dos lncRNAs *H19* e *KCNQ1OT1*, podem configurar mecanismos moleculares relevantes associados à endometriose, além de possivelmente diferirem entre os fenótipos da doença. Essas alterações epigenéticas podem impactar processos celulares fundamentais, como o crescimento celular desregulado, uma das principais características da endometriose (Figura 5).

Figura 5 - Possível mecanismo epigenético da participação do imprinting genômico e dos lncRNAs *H19* e *KCNQ1OT1* na endometriose



Fonte: Própria autora com a ferramenta de design gráfico online Canva (<https://www.canva.com>).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os aspectos epigenéticos das regiões controladoras de *imprinting* KvDMR1 e H19DMR em pacientes com endometriose

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o padrão de metilação da região controladora de *imprinting* H19DMR em pacientes com endometriose;
- Avaliar o padrão de metilação da região controladora de *imprinting* KvDMR1 em pacientes com endometriose;
- Analisar a expressão do gene lncRNA *H19* em pacientes com endometriose;
- Analisar a expressão do gene lncRNA *KCNQ1OT1* em pacientes com endometriose;
- Investigar a frequência alélica e genotípica dos SNPs localizados nas H19DMR em pacientes com endometriose;
- Investigar a expressão gênica dos genes *CDKN1C*, *DNMNT1*, *DNMT2*, *DNMT3a*, *DNMT3b* e *IGF2* por meio da análise de dados públicos disponíveis no *Human Protein Atlas*;
- Correlacionar os achados de metilação e expressão gênica com os dados clínicos das pacientes com endometriose.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 CASUÍSTICA E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Trata-se de um estudo retrospectivo, observacional e transversal, no qual foram avaliadas pacientes com suspeita de endometriose atendidas no Setor de Endoscopia Ginecológica da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC), que faz parte do complexo hospitalar da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob coordenação do Prof. Dr. Leonardo Robson Sobreira Bezerra realizadas de dezembro de 2019 a dezembro de 2020.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, e aprovado sob protocolo CAAE 85724824.8.0000.5050. As pacientes foram previamente informadas sobre a realização do estudo, sendo incluídas as pacientes que preencheram os critérios de inclusão preestabelecidos e que consentiram em participar do estudo após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A).

##### *3.1.1 Critérios de inclusão*

Foram incluídas no estudo mulheres com idade entre 18 e 49 anos, com suspeita de endometriose, sem tratamento cirúrgico prévio, com ciclos menstruais regulares em um intervalo entre os ciclos variando de 26 a 34 dias e vida sexual progressa, que mediante assinatura do TCLE, concordaram em participar do estudo.

##### *3.1.2 Critérios de exclusão*

Foram excluídas pacientes que possuíam alguma comorbidade relacionada, ou outra causa de infertilidade, portadoras de doenças autoimune ou quadro de infecção ou outras doenças que possam ser confundidas. Além disso, foram excluídas pacientes que não assinaram o TCLE.

### 3.2 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras foram obtidas através de cirurgia de videolaparoscopia realizada pelo Prof. Dr. Leonardo Robson Sobreira Bezerra, estando as pacientes anestesiadas de acordo com os protocolos assistenciais do setor de Ginecologia e Obstetrícia da Maternidade Escola de Assis Chateaubriand – UFC. O tecido coletado foi acondicionado em microtubos de 1,5 mL, estéril com adição de RNA*later* (Thermo Fischer Scientific, EUA), o qual previne a degradação e protege a integridade do RNA no tecido coletado. As amostras coletadas foram transportadas sob refrigeração e armazenadas em freezer -80°C no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da UFC até o seu processamento.

As amostras coletadas foram selecionadas para o estudo após a realização da análise histológica em lâminas por microscopia óptica, o que permitiu confirmar o diagnóstico de lesões compatíveis com endometriose estromal e glandular. O critério de classificação das amostras foi realizado com base na localização anatômica das lesões coletadas. Dessa forma, as lesões provenientes da região abdominal de forma não invasiva, como aquelas localizadas no ovário, na fossa ovariana e no peritônio, foram consideradas endometriose superficial peritoneal. Por sua vez, as lesões localizadas em estruturas mais profundas ou em órgãos de outros sistemas, como septo retovaginal, bexiga, ligamento uterossacro e endometrioma ovariano, foram classificadas como endometrioma/endometriose infiltrativa profunda.

### 3.3 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) dos tecidos endometrióticos foram extraídos através da utilização do kit MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification (Epicentre, USA), o qual permite a extração tanto de DNA quanto de RNA com pequenas modificações no protocolo a depender do tipo de ácido nucleico desejado. Uma porção de aproximadamente 10 mg do tecido endometriótico coletado foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e adicionados 300 µL de *Tissue and Cell Lysis Solution* e 1 µL de *Proteinase K*. Após a mistura ser homogeneizada, o material foi incubado em banho seco a 65

°C por 15 min com intervalos de realização de vórtex a cada 5 min. Para a obtenção de DNA, as amostras digeridas passaram por uma nova incubação a 37 °C por 30 min com 1 µL de 5 µg/ µL RNase A. Depois, foi realizado um choque térmico no freezer -30 °C por 5 min. Posteriormente, adicionou-se 150 µL de *MPC Protein Precipitation Reagent*, agitou-se a mistura e o microtubo foi centrifugado a 12.000 x g a 4°C por 10 min. Para a obtenção de RNA, as amostras digeridas passaram por uma nova incubação a 37°C por 10 min com 200 µL de DNase I Solution. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo com adição de 500 µL de isopropanol, realizado uma nova centrifugação e eliminação cuidadosa do sobrenadante. O pellet foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% e, após a evaporação, o ácido nucleico foi eluído em 35 µL de tampão Tris-EDTA (TE) 10 mM, pH 7.5.

A quantidade em ng/ µL e a qualidade do DNA e RNA extraídos (razões A260/230 e A260/280) foi avaliada por espectrofotometria com NanoDrop-2000 (ThermoFisher Scientific, EUA). Os ácidos nucleicos, DNA e RNA, foram armazenados em freezers -20 °C e -80 °C, respectivamente, até a utilização posterior nas técnicas de biologia molecular.

### **3.4 PADRÃO DE METILAÇÃO POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

#### *3.4.1 Conversão do DNA por Bissulfito de Sódio*

O padrão de metilação de regiões controladoras de *imprinting* (KvDMR1 e H19DMR) foram avaliados por sequenciamento de nova geração (NGS) pós-modificação do DNA com bissulfito de sódio. Para tal, utilizou o kit de conversão EZ DNA Methylation (Zymo Research, EUA), de acordo com as especificações do fabricante, o qual permite a conversão *in vitro* das citosinas não metiladas presentes no DNA em uracilas (HERMAN et al., 1996).

A partir de um input de 200 ng de DNA genômico extraído de cada amostra, adicionou-se 5 µl do tampão *M-Dilution*, sendo o volume ajustado para 50 µl com água livre de nucleases. Os tubos foram incubados durante 15 min a 37 °C e, posteriormente, adicionou-se 100 µl do reagente *CT Conversion*, sendo a conversão realizada no termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler

(Applied Biosystem, EUA) a 50 °C durante 16 h. O material convertido foi combinado com tampão M-Binding e purificado com tampões específicos (*M-Wash* e *M-Desulphonation*) em colunas de sílica Zymospin™ IC do kit com centrifugação a 14.000 x g por 30 s. O DNA convertido e purificado foi eluído em 15 µL de tampão *M-Elution* e estocado a -20 °C até a etapa de preparação das bibliotecas.

### 3.4.2 Preparação das bibliotecas e Sequenciamento de Nova Geração

A primeira etapa da preparação das bibliotecas consistiu em uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores específicos acoplados a adaptadores Nextera, descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição das sequências dos primers usados na reação de PCR para as regiões H19DMR e KvDMR1

Nome do primer	Sequência de nucleotídeos
H19DMR Forward	5'- <b>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</b> TATGGGTA TTTTTGGAGGTTTTTT-3'
H19DMR Reverse	5'- <b>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG</b> AATCCCA A ACCATAAACTAAAAC -3'
KvDMR1 Forward	5'- <b>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</b> GTTATTTAG TTAATTYGTGTAGTAGTT - 3'
KvDMR1 Reverse	5'- <b>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG</b> CAAATC TACTAAAAAACTCCCTA-3'

As regiões em negrito são os adaptadores, ou seja, são regiões complementares a uma porção dos identificadores da Illumina Nextera XT, os quais permitem a indexação das amostras.

As regiões analisadas compreenderam 23 dinucleotídeos CpGs para a H19DMR (Figura 6A) e 18 dinucleotídeos CpGs para a KvDMR1 (Figura 6B). As reações de PCR foram realizadas no termociclador programável Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystem, EUA) com a enzima Platinum™ II Hot-Start PCR Master Mix (2X) (Invitrogen, EUA), utilizando 10 pmol de cada iniciador e 1 µL

de DNA modificado para um volume final de 30  $\mu\text{L}$ , de acordo com as seguintes condições: aquecimento inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, anelamento a 59 °C (iniciadores da H19DMR) ou 60 °C (iniciadores da KvDMR) por 45 s, extensão a 72 °C por 45 s e, posteriormente, uma extensão final de 72 °C por 10 min. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5% (m/v) com 5% de brometo de etídio, e mantidos a -20 °C até a purificação da biblioteca.

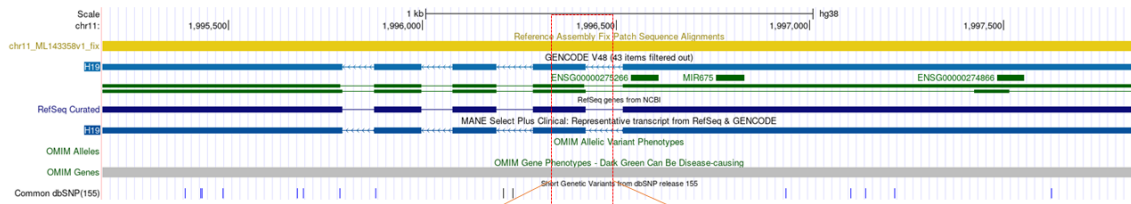
Os produtos da amplificação da PCR foram purificados utilizando 20  $\mu\text{L}$  de beads magnéticas da Agentcourt AMPure XP-PCR (Beckman Coulter, EUA) com auxílio de um suporte magnético. As lavagens foram realizadas com 200  $\mu\text{L}$  de etanol 80% recém preparado e eluição em Tris-EDTA 10mM pH 8,5. O material purificado foi submetido a uma nova PCR para a inserção dos identificadores de sequenciamento (indexes ou barcodes), usando 25  $\mu\text{L}$  de 2X KAPA HiFi Ready Start Mix (Roche, Switzerland), 10  $\mu\text{L}$  de água ultrapura livre de nucleases (Promega, USA), 5  $\mu\text{L}$  de index i5, 5  $\mu\text{L}$  de index i7 do kit Nextera XT Index (Illumina, EUA) e 5  $\mu\text{L}$  do produto da PCR com iniciadores específicos, totalizando 50  $\mu\text{L}$  de reação. A reação de PCR de indexação ocorreu no termociclador programável Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystem, EUA) consistindo em um aquecimento inicial a 95 °C por 3 min, seguido de 12 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20 s, anelamento a 55°C por 30 s, extensão a 72 °C por 30 s e, posteriormente, uma extensão final de 72 °C por 5 min.

Figura 6 - Sequência genômica das DMRs com o alinhamento dos iniciadores

A)

H19DMR

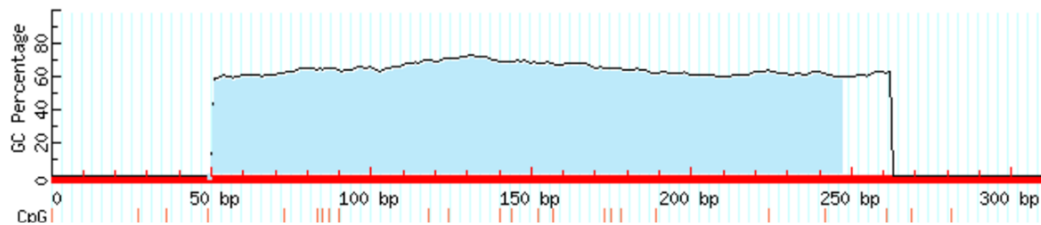
Position at UCSC database: chr11:1995176-1997842



```

catgggtatttctggaggcttctccttgggtctcacccctggatggcaggaattggtgt
agtgtggaatggaagtggccggcgccggcagctgcaggctcacacatcacagccagagcc
gcccccaactggggttggccgttggaatctccgggtcacccaagccagcgtgacaggtt
tcaaggggtcatctgggaataggacctcataggagccaccagatcttcaggtgggca
ttaaccacagccccctggcccgggtcacactccagggttcagtgatggcctgggactc

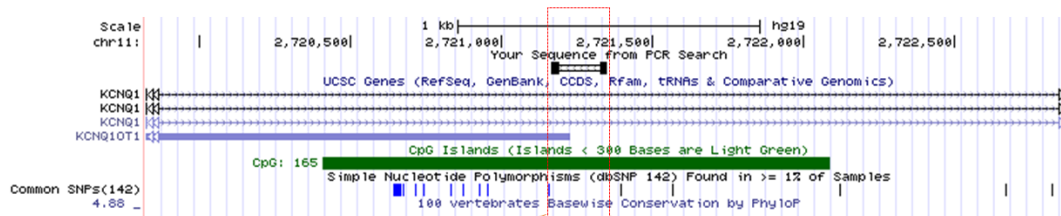
```



B)

KvDMR1

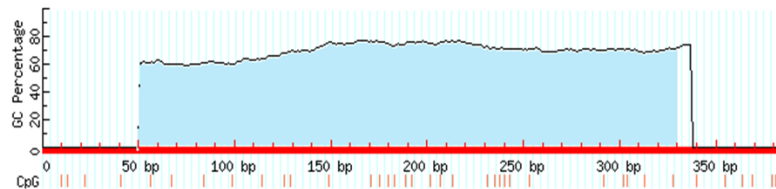
Position at UCSC database: chr11:2721166-2721351



```

gcaccagccaatccgtgagcagcccgcaagccttcacctgctgcaccaatcagcaggtggggg
gggtgccaatcagcagggggggcagtgagagctgcagctccaggcagaaagtgccg
ctgacctcagcagagacctccaggagctcctcagcaagatcctg

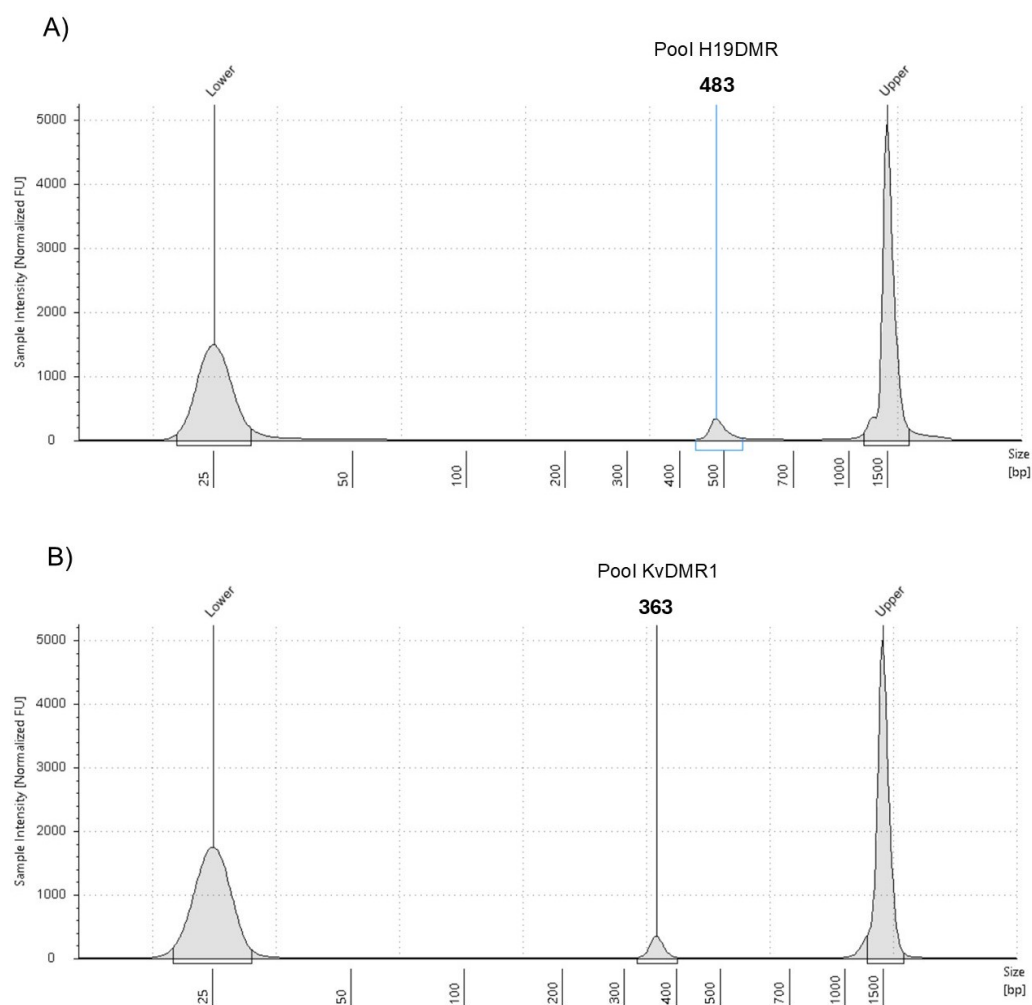
```



Fonte: Própria autora. Representação genômica das regiões H19DMR (A) e KvDMR1 (B) no cromossomo 11, destacando a região complementar aos iniciadores (em amarelo) e os dinucleotídeos CpG (em verde). O gráfico inferior apresenta o percentual de conteúdo GC ao longo da sequência, evidenciando o conteúdo GC acima de 60%.

Em seguida, houve uma nova purificação com beads Agentcourt AMpure XP-PCR (Beckman Coulter, EUA) e etanol 80%, seguido de eluição em Tris-EDTA 10 mM pH 8,5. As bibliotecas foram então quantificadas por fluorimetria, utilizando o kit dsDNA BR Assay (Invitrogen, EUA) em fluorímetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, EUA). As bibliotecas foram normalizadas e diluídas para 4 nM, sendo 5 µl de cada biblioteca combinadas em um único microtubo, formando um pool. O *pool* de bibliotecas foi quantificado no fluorimetria, utilizando o kit DNA HS Assay kit (Invitrogen, EUA) e o tamanho dos fragmentos obtido pelo equipamento TapeStation 4150 (Agilent, EUA) através do kit DNA 1000 (Agilent, EUA), de acordo com as instruções do fabricante (Figura 7).

Figura 7- Análise dos fragmentos dos pools das bibliotecas de amostras preparada para sequenciamento de nova geração para H19DMR e KvDMR1



Eletroferograma representativo do pool dos produtos amplificados da região H19DMR com pico central em 483 pb (A) e KvDMR1 com pico central em 363 pb (B). Os picos “Lower” e “Upper” correspondem aos padrões de referência de tamanho do ensaio D1000.

O pool de bibliotecas foi diluído a 12 pMol, desnaturado com Hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 N, recém preparado, e combinado com 25% de PhiX (Illumina, EUA) para o carregamento no sequenciador. O sequenciamento foi realizado na Central de Genômica e Bioinformática (CeGenBio) localizada no NPDM da UFC, na plataforma Illumina MiSeq (Illumina, EUA), utilizando o kit de reagente Miseq v3-600 ciclos (Illumina, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.4.3 Análises de bioinformática

Para cada paciente do estudo, obteve-se os arquivos no formato FASTQ em ambos os sentidos de leitura. A qualidade das sequências foi avaliada utilizando o software FastQC (Babraham Bioinformatics), enquanto a remoção dos adaptadores foi realizada com o Trimmomatic (BOLGER et al., 2014). Para visualizar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), foi empregado a plataforma online IGV – *Integrative Genomics Viewer* (<https://igv.org/doc/desktop/>) enquanto a observação dos dinucleotídeos CpG metilados nas regiões de interesse foi realizada por meio da plataforma TABSAT v1.0.2 (<https://tabsat.ait.ac.at/>), a qual atualmente se encontra indisponível para acesso online.

## 3.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

### 3.5.1 Síntese do cDNA

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total extraído foi utilizado o kit High-Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, EUA), conforme as recomendações do fabricante. A reação teve um volume total de 20 µL, sendo composta por 10 µL de 2x RT Buffer Mix, 1 µL de 20x RT Enzyme Mix, até 9 µL de RNA total extraído (para uma quantidade máxima de 2000 ng) e água ultrapura livre de nucleases para completar o volume da reação (Promega, USA). A reação de PCR ocorreu no termociclador programável Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystem, EUA) consistindo em incubação a 37°C por 60 min, parada de reação a 95 °C por 5 min e posterior manutenção da

temperatura em 4 °C. O cDNA foi mantido em freezer –30 °C até a utilização nas reações de PCR em tempo real (qPCR).

### 3.5.2 PCR em tempo real

As análises da expressão gênica dos lncRNAs foram realizadas utilizando o sistema de detecção de sequências TaqMan® (Thermo Fisher Scientific, EUA) com as sondas de hidrólise contando com o fluoróforo FAM na porção 5' e o *quencher* MGB na porção 3' para os genes descritos na Tabela 2. A eficiência geométrica das sondas TaqMan® é garantida em 100% pelo fabricante. Para isso, as reações de qPCR foram preparadas com 5 µL de 2x TaqMan Fast Advanced Master Mix, 0,5 µL de cada sonda de hidrólise, 2,5 µL de água ultrapura livre de nucleases e 2 µL de cDNA a 150 ng/µL. Cada reação para os genes analisados foram realizadas em triplicata e com a presença de controle negativo.

A quantificação relativa da expressão dos genes analisados foi calculada através do Cq (*Quantification cycle*) obtido para cada amostra de acordo com o método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) utilizando a média de dois genes de referência para normalização: *β-actina* (Hs01060665\_g1) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH* - Hs02758991\_g1), além de placenta como amostra referência.

Tabela 2 - Descrição das sondas utilizadas na reação de qPCR para a expressão gênica das regiões H19DMR e KvDMR1

Região analisada	Nome da sonda	Código	Amplicon
H19DMR	<i>H19</i>	Hs00399294_g1	62 pb
KvDMR1	<i>KCNQ1OT1</i>	Hs04991170_s1	143 pb

As reações ocorreram no termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR (Biorad, EUA) da seguinte forma: desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 s com anelamento e extensão a 60 °C por 30 s.

### 3.6 QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA POR PCR DIGITAL (dPCR)

Foram selecionadas duas amostras com valor de Cq em torno de 32 na reação de qPCR para expressão gênica dos lncRNAs, com o objetivo de realizar a quantificação absoluta e verificar a ausência de detecção, por dPCR, dos genes *IGF2* e *CDKN1C*.

As reações de dPCR foram realizadas no equipamento QuantStudio Absolute Q (Thermo Fisher Scientific, EUA), utilizando 2 µL de 5x dPCR Master Mix, 0,5 µL de cada sonda de hidrólise (Tabela 3), 2 µL de cDNA a 150 ng/µL e 5,5 µL de água ultrapura livre de nucleases. Posteriormente à distribuição das reações aos poços da placa, adicionou-se 15 µL de Absolute Q Isolation Buffer.

Tabela 3 - Descrição das sondas utilizadas na reação de dPCR para quantificação absoluta das regiões H19DMR e KvDMR1

Região analisada	Nome da sonda	Código	Amplicon
H19DMR	<i>H19</i>	Hs00399294_g1	62 pb
	<i>IGF2</i>	Hs04188276_m1	83 pb
KvDMR1	<i>KCNQ1OT1</i>	Hs04991170_s1	143 pb
	<i>CDKN1C</i>	Hs00175938_m1	91 pb

A desnaturação inicial aconteceu a 96 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 96 °C por 5 s, anelamento e extensão a 60 °C por 15 s. Os resultados obtidos foram analisados por meio do software Absolute Q Analysis (Thermo Fisher Scientific, EUA).

### 3.7. PESQUISA EM BANCO DE DADOS PÚBLICOS

Foram consultados os níveis de expressão de genes de interesse (*DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *IGF2* e *CDKN1C*) utilizando dados públicos do portal *The Human Protein Atlas* (HPA) em: <https://www.proteinatlas.org> nas categorias de RNA-seq em unidades TPM (transcritos por milhão) no endométrio, utilizando o módulo *Tissue Atlas*. As

informações obtidas foram utilizadas para contextualizar o padrão de expressão, com base no consenso com os dados normalizados HPA e *Genotype-Tissue Expression* (GTEx).

A frequência alélica dos SNPs rs2107425 e rs2071094 foi consultada na base de dados Ensembl (<https://www.ensembl.org/>), utilizando a ferramenta *Population Genetics*. Foram analisadas as frequências da população latino-americanas (AMR) com base nos dados do projeto *1000 Genomes*. Além disso, foi realizada uma pesquisa de *hotspots* relacionados ao câncer na plataforma cBioPortal for *Cancer Genomics* em: <https://www.cbioportal.org>, utilizando dados do TCGA Pan-Cancer Atlas (CERAMI et al., 2012).

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises de expressão gênica, utilizou-se o Microsoft Excel para a normalização dos dados através dos cálculos do  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Os testes estatísticos e gráficos foram realizados com auxílio do software GraphPad Prism versão 8.0.1 (GraphPad Software, EUA). Para avaliação da normalidade dos dados, utilizou-se o teste Shapiro-Wilk. Nas análises paramétricas, utilizou-se o teste *t* de Welch enquanto, para as não paramétricas, foram realizadas o teste de Kolmogorov-Smirnov, considerando o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

Nas verificações de correlação, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson (*r*) para variáveis numéricas, enquanto o teste *t* com correção de Welch foi aplicado entre variáveis nominais e numéricas. Para a comparação entre amostras obtidas de uma mesma paciente, empregou-se o *one-way* ANOVA quando havia três locais de coleta e o teste *t* com correção de Welch quando havia apenas dois locais.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização dos pacientes

Inicialmente, foram coletadas lesões suspeitas de endometriose provenientes de 26 pacientes. Após análise histológica das biópsias por microscopia óptica, as amostras que não apresentaram critérios morfológicos compatíveis com endometriose estromal ou glandular foram excluídas. Assim, a casuística foi composta por 15 pacientes, totalizando 24 amostras.

As amostras derivaram de diferentes sítios anatômicos: 11 lesões do septo retovaginal, quatro da fossa ovariana, três da bexiga, duas do ligamento uterossacro, uma do reto, uma do peritônio, uma do ovário e um endometrioma ovariano. (Tabela 4). Seis pacientes tiveram tecido endometrial ectópico coletado de mais de um local: septo retovaginal e fossa ovariana; septo retovaginal e bexiga; septo retovaginal, ovário e fossa ovariana; fossa ovariana e ligamento uterossacro; septo retovaginal, bexiga e reto; septo retovaginal e peritônio.

Com relação a idade dos pacientes, a média foi 33,5 de anos e a mediana 32 anos, sendo o mínimo de 18 anos e máximo de 46 anos. A maioria das pacientes são originárias de Fortaleza - CE (60%), enquanto cinco eram do interior e duas fora do estado do Ceará. Quanto ao estado civil, oitos pacientes relataram serem casadas (53,3%), quatro estavam solteiras (26,7%), duas divorciadas (13,3%) e uma em união estável (6,7%).

Os outros dados clínicos não estão completos para todas as pacientes. A maioria (66,7%) apresentou, no momento da coleta, o índice de massa corporal (IMC) dentro dos limites normais (18,5 – 24,99). O uso de medicamentos hormonais foi relatado por 11 pacientes (84,6%), como anticoncepcionais orais e dienogeste. Nove pacientes (69,2%) informaram que nunca engravidaram e, dentre as quatro pacientes com gravidez prévia, duas delas sofreram aborto.

Quatro pacientes informaram histórico familiar de endometriose, envolvendo parentes de primeiro ou segundo grau (mãe, tia, irmã ou prima); três pacientes informaram a presença de casos de câncer na família e quatro revelaram não terem parentes com endometriose. Os sintomas relatados pelas pacientes foram: dismenorreia (50%), dispareunia (42,9%), diarreia menstrual

(28,6%), cólicas menstruais (28,6%), fluxo menstrual intenso (21,4%), cólicas pré-menstruais (21,4%), constipação (14,3%), dor lombar (14,3%), infertilidade (14,3%), disúria (7,1%) e período menstrual prolongado (7,1%).

Tabela 4 - Caracterização sociodemográfica e das variáveis clínicas das pacientes com endometriose

Variável	Descrição	Número de pacientes	Porcentagem
Origem da lesão	Septo retovaginal (SRV)	11	45,8%
	Fossa ovariana (FOE)	4	16,7%
	Bexiga (LB)	3	12,5%
	Ligamento uterossacro (LUSE)	2	8,3%
	Reto (LR)	1	4,2%
	Peritônio (EP)	1	4,2%
	Ovário esquerdo (OE)	1	4,2%
	Endometrioma ovariano (EOE)	1	4,2%
Idade	18 anos	1	6,7%
	19-30 anos	4	26,6%
	31-40 anos	9	60%
	> 40 anos	1	6,7%

<b>Variável</b>	<b>Descrição</b>	<b>Número de pacientes</b>	<b>Porcentagem</b>
<b>Localidade</b>	Fortaleza-CE	9	60%
	Interior do CE	4	26,7%
	Outro estado	2	13,3%
<b>Estado civil</b>	Casada	8	53,3%
	Divorciada	2	13,3%
	Solteira	4	26,7%
	União estável	1	6,7%
<b>Vínculo empregatício</b>	Sim	12	85,7%
	Não	2	14,3%
<b>IMC</b>	18,5 – 24,99 (Normal)	8	66,7%
	25 – 29,99 (Acima do peso)	1	8,3%
	30 – 39,99 (Obesidade I)	3	25%
<b>Uso de hormônio</b>	Sim	11	84,6%
	Não	2	15,4%

Variável	Descrição	Número de pacientes	Porcentagem
<b>Gravidez anterior</b>	Sim	4	30,8%
	Não	9	69,2%
<b>Caso familiar</b>	Endometriose	4	36,4%
	Câncer	3	27,2%
	Não	4	36,4%
<b>Sintomas</b>	Dismenorreia	7	50%
	Dispareunia	6	42,9%
	Diarreia menstrual	4	28,6%
	Cólicas menstruais	4	28,6%
	Fluxo menstrual intenso	3	21,4%
	Cólicas pré-menstruais	3	21,4%
	Constipação	2	14,3%
	Dor lombar	2	14,3%
	Infertilidade	2	14,3%
	Disúria	1	7,1%
	Período menstrual prolongado	1	7,1%

## 4.2. Análise do sequenciamento pós-modificação com bissulfito de sódio (Bis-seq)

Com relação a ICR 1 - H19DMR, as reads obtidas ficaram superior a 60.000, com exceção das amostras S11 (6733 reads) e S12 (66 reads). A média do número de reads foi  $42,98\% \pm 5,38\%$  reads metiladas,  $56,64\% \pm 5,32\%$  reads não metiladas e  $0,37\% \pm 0,21\%$  reads parcialmente metiladas. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na metilação entre as amostras superficiais e as amostras de endometrioma/infiltrativa profunda ( $p = 0,6340$ ), após a exclusão da amostra S12, que apresentou quantidade de reads significativamente inferior. Três amostras analisadas (12,5%) apresentaram hipometilação (inferior a 35%): S05, S17 e S18 (Tabela 5).

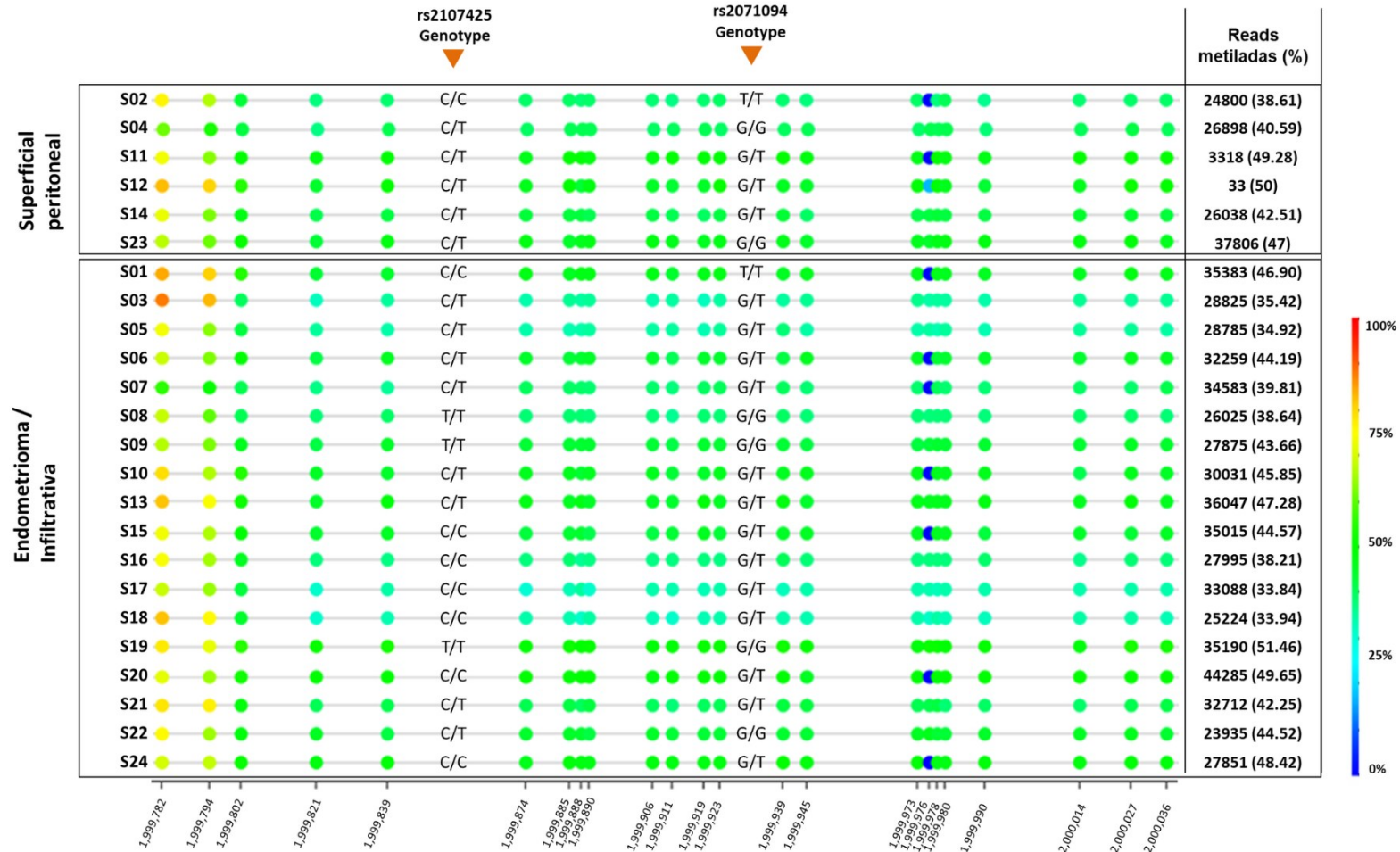
Tabela 5 -Metilação da H19DMR distribuídas por classificação do local de lesão

Classificação por local de lesão	ID	Total de reads	Reads metiladas (%)	Reads não metiladas (%)	Reads parcialmente metiladas (%)
Superficial peritoneal	S02	64233	24800 (38,61%)	39070 (60,83%)	363 (0,57%)
	S04	66271	26898 (40,59%)	39132 (59,05%)	241 (0,36%)
	S11	6733	3318 (49,28%)	3403 (50,54%)	12 (0,18%)
	S12	66	33 (50%)	33 (50%)	0 (0%)
	S14	61257	26038 (42,51%)	34910 (56,99%)	309 (0,50%)
	S23	80436	37806 (47,00%)	42347 (52,65%)	283 (0,35%)
	Endometrioma/ Infiltrativa	S01	75325	35383 (46,90%)	39805 (52,84%)
S03		175680	28825 (35,42%)	52034 (63,94%)	516 (0,36%)
S05		82430	28785 (34,92%)	53417 (64,80%)	228 (0,28%)

<b>Classificação por local de lesão</b>	<b>ID</b>	<b>Total de reads</b>	<b>Reads metiladas (%)</b>	<b>Reads não metiladas (%)</b>	<b>Reads parcialmente metiladas (%)</b>
Endometrioma/ Infiltrativa	S06	73006	32259 (44,19%)	40422 (55,37%)	325 (0,45%)
	S07	86869	34583 (39,81%)	52158 (60,04%)	128 (0,15%)
	S08	67352	26025 (38,64%)	40957 (60,81%)	370 (0,55%)
	S09	63842	27875 (43,66%)	35492 (55,59%)	475 (0,74%)
	S10	65498	30031 (45,85%)	35256 (53,83%)	211 (0,32%)
	S13	76247	36047 (47,28%)	39909 (52,34%)	291 (0,38%)
	S15	78556	35015 (44,57%)	43248 (55,05%)	293 (0,37%)
	S16	73264	27995 (38,21%)	44882 (61,26%)	387 (0,53%)
	S17	97774	33088 (33,84%)	64425 (65,89%)	261 (0,27%)
	S18	128267	25224 (33,94%)	48830 (65,71%)	262 (0,35%)
	S19	111657	35190 (51,46%)	33091 (48,39%)	98 (0,14%)
	S20	89191	44285 (49,65%)	44726 (50,15%)	180 (0,20%)
	S21	77418	32712 (42,25%)	44636 (57,66%)	70 (0,09%)
	S22	53762	23935 (44,52%)	29333 (54,56%)	494 (0,92%)
S24	57518	27851 (48,42%)	29358 (51,04%)	309 (0,54%)	

As diferenças de metilação entre as 23 ilhas CpGs analisadas foram mais consideráveis em três posições: CpG1 (Chr11: 1 999 782), CpG2 (Chr11: 1 999 794) e CpG17 (Chr11: 1 999 976). As primeiras duas posições apresentaram um padrão de hipermetilação em 62,5% e 29,17% das amostras analisadas, respectivamente. As amostras S01, S02, S03, S05, S07, S10, S11, S12, S15, S17, S18, S20 e S24 (54,17%) apresentaram reads hipometiladas na posição CpG17 (Chr11: 1 999 979), como demonstrado na Figura 8.

Figura 8 - Padrão de metilação da H19DMR entre os grupos estudados



Fonte: Própria autora. Cada ponto representa uma posição das ilhas GpG analisadas na região H19DMR das amostras do estudo, destacando os genótipos dos SNPs nas posições rs2107425 e rs2071094. A barra de cores à direita indica a porcentagem de metilação, variando de 0% (azul) a 100% (vermelho).

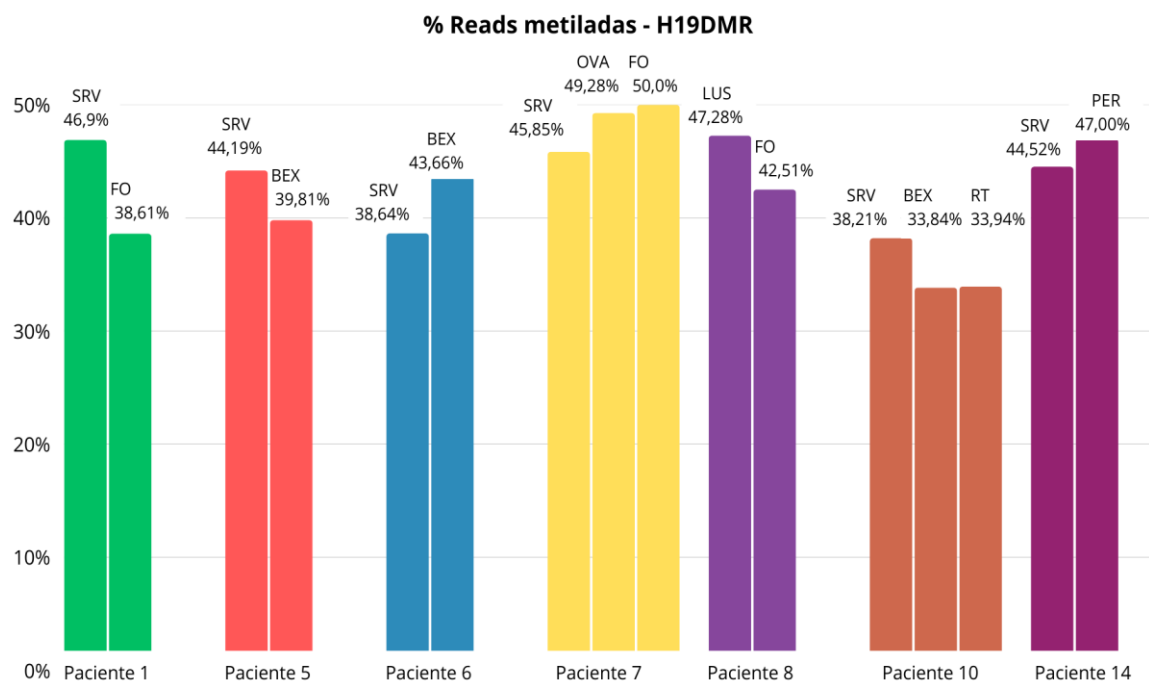
A análise dos SNPs demonstrou um predomínio do padrão heterozigoto (C/T) em 8 amostras (53,3%) na região rs2107425 e (G/T) em 10 amostras (66,6%) na região rs2071094 como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Distribuição da frequência genotípica e alélica dos Polimorfismos de Base Única (SNPs): rs2107425 e rs207109 nas amostras analisadas

	Polimorfismo de Base Única (SNP)					
	rs2107425			rs2071094		
	C/C	C/T	T/T	G/G	G/T	T/T
Frequência genotípica	5 (33,3%)	8 (53,3%)	2 (13,4%)	4 (26,7%)	10 (66,6%)	1 (6,7%)
Frequência alélica	C=0,6 / T=0,4			G=0,6 / T=0,4		

Dentre as amostras coletadas de uma mesma paciente, não houve diferença estatística significativa na análise da porcentagem de leituras metiladas da região H19DMR ( $p=0,4664$  nas pacientes com dois locais de coleta e  $p=0,9309$  nas pacientes com três locais de coleta). Todas as amostras analisadas da Paciente 10 obtiveram porcentagem de reads metiladas inferiores a 40%, sendo duas delas hipometiladas - 33,84% e 33,94% (Figura 9).

Figura 9 - Percentual de leituras metiladas na região H19DMR em diferentes lesões proveniente de pacientes com endometriose



Fonte: Própria autora com a ferramenta de desing gráfico online Canva (<https://www.canva.com>). Cada barra corresponde a um tecido ou local anatômico coletado (SRV: septo retovaginal; FO: fossa ovariana; BEX: bexiga; OVA: ovário; LUS: ligamento uterosacro; RT: reto; PER: peritônio). As amostras coletadas de uma mesma paciente estão representadas pela mesma cor.

O Bis-Seq da região ICR 2 - KvDMR resultou, na maioria das amostras, em reads superiores a 110.000, com exceção das amostras S09 (99917 reads) e S12 (274 reads). A média do número de reads foi 58,79%  $\pm$  4,74% reads metiladas, 40,88%  $\pm$  4,66% reads não metiladas e 0,33%  $\pm$  0,12% reads parcialmente metiladas. Também não houve diferença estatística da metilação obtida entre as amostras superficiais peritoneais e as amostras de endometrioma/infiltrativa profunda ( $p=0,7580$ ), após a exclusão da amostra S12, que apresentou quantidade de reads significativamente inferior. Duas amostras (8,33%) – S10 e S20 - apresentaram um padrão considerado hipermetilado (acima de 65%) (Tabela 7).

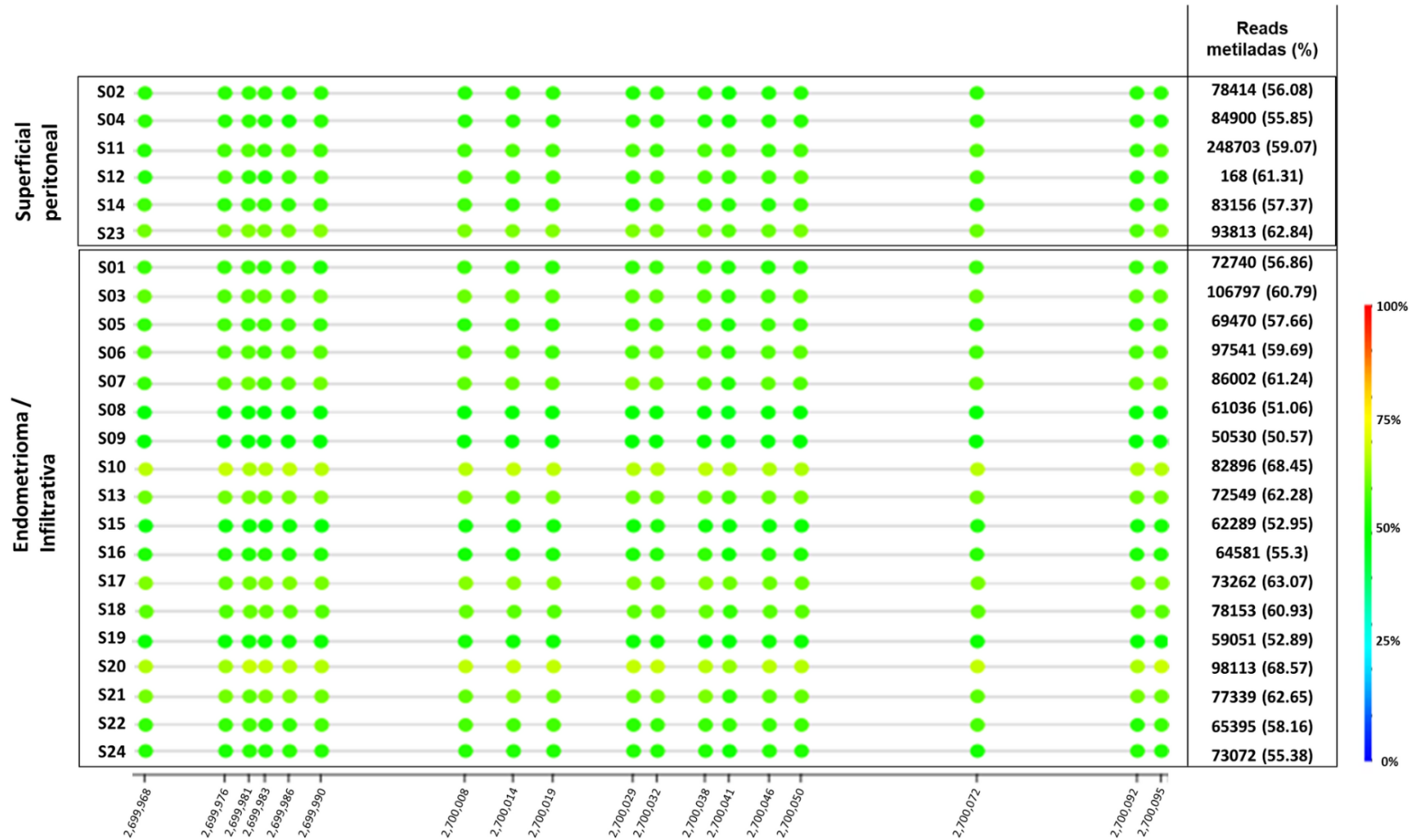
Tabela 7 - Metilação da KvDMR distribuídas por classificação do local de lesão

<b>Classificação por local de lesão</b>	<b>ID</b>	<b>Total de reads</b>	<b>Reads metiladas (%)</b>	<b>Reads não metiladas (%)</b>	<b>Reads parcialmente metiladas (%)</b>
Superficial peritoneal	S02	139826	78414 (56,08%)	60943 (43,58%)	469 (0,34%)
	S04	152023	84900 (55,85%)	66723 (43,89%)	400 (0,26%)
	S11	421047	248703 (59,07%)	170818 (40,57%)	1526 (0,36%)
	S12	274	168 (61,31%)	106 (38,69%)	0 (0%)
	S14	144944	83156 (57,37%)	61061 (42,13%)	727 (0,5%)
	S23	149286	93813 (62,84%)	55028 (36,86%)	445 (0,3%)
Endometrioma / Infiltrativa	S01	127924	72740 (56,86%)	54649 (42,72%)	535 (0,42%)
	S03	175680	106797 (60,79%)	68183 (38,81%)	700 (0,4%)
	S05	120490	69470 (57,66%)	50581 (41,98%)	439 (0,36%)
	S06	163399	97541 (59,69%)	65537 (40,11%)	321 (0,2%)
	S07	140440	86002 (61,24%)	54096 (38,52%)	342 (0,24%)
	S08	119528	61036 (51,06%)	57925 (48,46%)	567 (0,47%)
	S09	99917	50530 (50,57%)	48882 (48,92%)	505 (0,51%)
	S10	121106	82896 (68,45%)	37849 (31,25%)	361 (0,3%)
	S13	116497	72549 (62,28%)	43460 (37,31%)	488 (0,42%)

Classificação por local de lesão	ID	Total de reads	Reads metiladas (%)	Reads não metiladas (%)	Reads parcialmente metiladas (%)
Endometrioma / Infiltrativa	S15	117644	62289 (52,95%)	54981 (46,74%)	374 (0,32%)
	S16	116792	64581 (55,3%)	51783 (44,34%)	428 (0,37%)
	S17	116152	73262 (63,07%)	42618 (36,69%)	272 (0,23%)
	S18	128267	78153 (60,93%)	49641 (38,7%)	473 (0,37%)
	S19	111657	59051 (52,89%)	52059 (46,62%)	547 (0,49%)
	S20	143088	98113 (68,57%)	44824 (31,33%)	151 (0,11%)
	S21	123448	77339 (62,65%)	45807 (37,11%)	302 (0,24%)
	S22	112443	65395 (58,16%)	46677 (41,51%)	371 (0,33%)
	S24	131941	73072 (55,38%)	58272 (44,17%)	597 (0,45%)

Não houve alteração de metilação entre as 18 ilhas CpGs (entre as posições (Chr11: 2 699 968 a Chr11: 2 700 095) analisadas no Bi-seq da KvDMR, como observado na Figura 10.

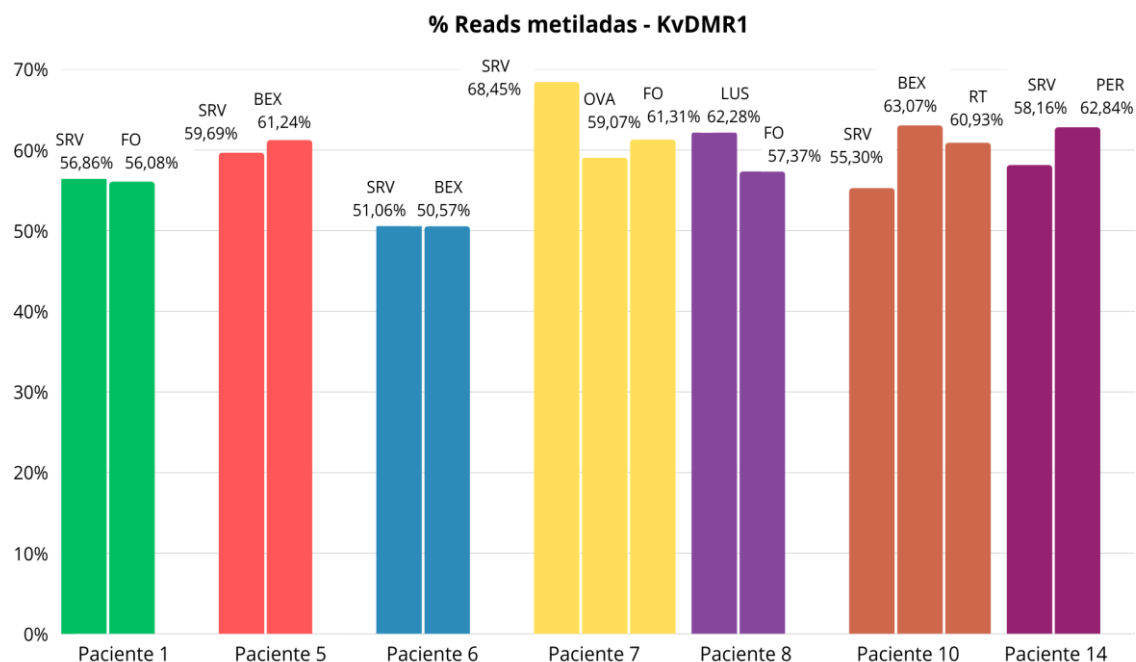
Figura 10 - Padrão de metilação da KvDMR1 entre os grupos estudados



Fonte: Própria autora. Cada ponto representa uma posição das ilhas GpG analisadas na região KvDMR das amostras do estudo. A barra de cores à direita indica a porcentagem de metilação, variando de 0% (azul) a 100% (vermelho).

Considerando as amostras coletadas de uma mesma paciente, também não houve diferença estatística significativa na análise da porcentagem de reads metiladas da região KvDMR1 ( $p=0,9952$  nas pacientes com dois locais de coleta e  $p=0,9358$  nas pacientes com três locais de coleta) (Figura 11).

Figura 11 - Percentual de leituras metiladas na região KvDMR1 em diferentes lesões proveniente de pacientes com endometriose

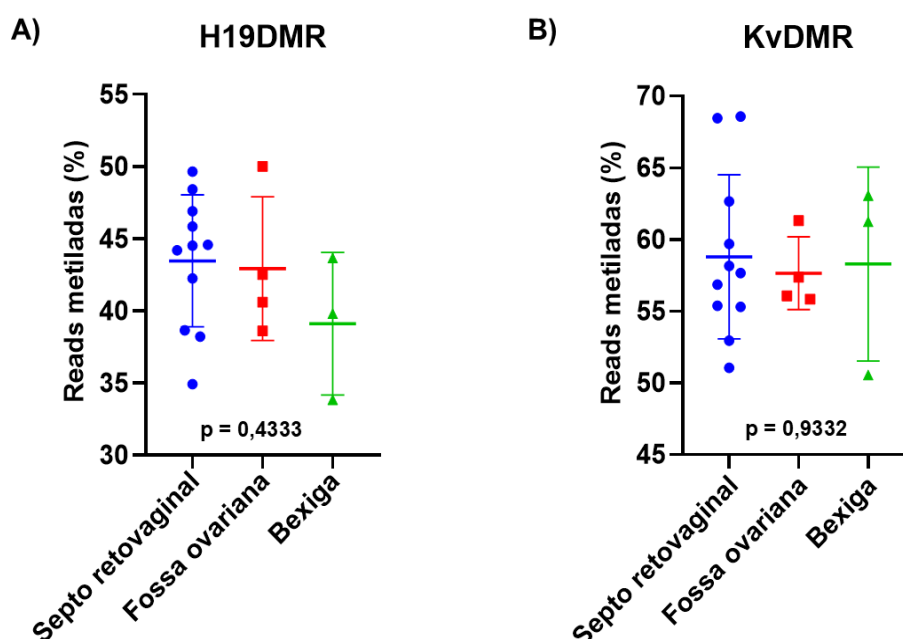


Fonte: Própria autora com a ferramenta de desing gráfico online Canva (<https://www.canva.com>). Cada barra corresponde a um tecido ou local anatômico coletado (SRV: septo retovaginal; FO: fossa ovariana; BEX: bexiga; OVA: ovário; LUS: ligamento uterosacro; RT: reto; PER: peritônio). As amostras coletadas de uma mesma paciente estão representadas pela mesma cor.

As figuras referentes ao padrão de metilação da H19DMR e KvDMR1 dividido por coletas em pacientes participantes do estudo estão apresentadas no Apêndice A.

Analisando a metilação por local de coleta das duas ICRs estudadas, incluindo os locais com três ou mais amostras, não houve diferença estatística ( $p=0,433$  - H19DMR;  $p=0,9332$  - KvDMR) entre a metilação das lesões do septo retovaginal, da bexiga e da fossa ovariana (Figura 12).

Figura 12 - Níveis de metilação das ICRs em relação aos locais de lesão: septoretovaginal, fossa ovariana e bexiga



Fonte: Própria autora utilizando o GraphPad Prism versão 8.0.1. A) Porcentagem de reads metiladas no septo retovaginal (em azul), na bexiga (em azul) e na fossa ovariana (em verde) para ICR1 - H19DMR. B) Porcentagem de reads metiladas no septo retovaginal (em azul), na bexiga (em azul) e na fossa ovariana (em verde) para a ICR2 - KvDMR.

Não houve correlação significativa entre a metilação das ICRs e as variáveis clínicas idade e IMC. Já nas variáveis nominais (uso de medicamentos hormonais, casos na família e paridade) somente houve significância entre a metilação da H19DMR e o uso de medicamentos hormonais, conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 - Correlação entre variáveis clínicas e a metilação da H19DMR e KvDMR1

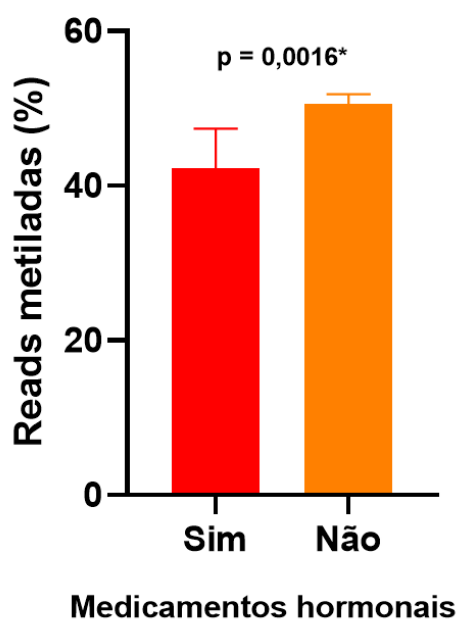
Variável	Metilação H19DMR	Metilação KvDMR
Idade	p = 0,926 r = 0,022	p = 0,787 r = - 0,063
IMC	p = 0,457 r = 0,200	p = 0,105 r = 0,420
Uso de medicamentos hormonais	p = 0,0016*	p=0,832
Casos na família	p = 0,274	p = 0,999

Paridade

 $p = 0,493$  $p = 0,098$ 

A análise da metilação evidenciou que o grupo de pacientes em uso de medicamentos hormonais apresentou menor porcentagem de reads metiladas em comparação ao grupo sem uso de hormônios. Essa diferença foi estatisticamente significativa ( $p = 0,0016$ ) (Figura 13).

Figura 13 - Comparação de reads metiladas da H19DMR e a utilização de medicamentos hormonais

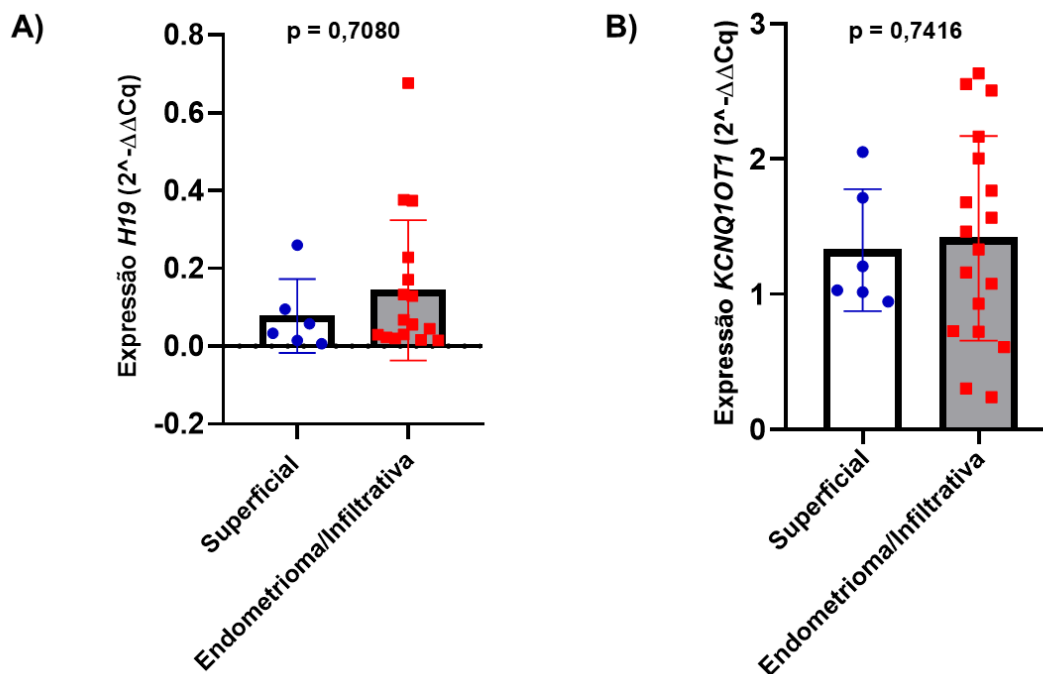


Fonte: Própria autora utilizando o GraphPad Prism versão 8.0.1. A porcentagem de reads metiladas na região H19DMR distribuída entre a utilização a base de hormônios (em vermelho) e a não utilização (em laranja) nas pacientes do estudo.

#### 4.3. Análise da expressão gênica

A diferença de expressão gênica de *KCNQ1OT1* e *H19* não foram estatisticamente significativas ( $p=0,7416$  e  $p=0,7080$ , respectivamente) entre as classificações dos locais de lesão coletados (Figura 14).

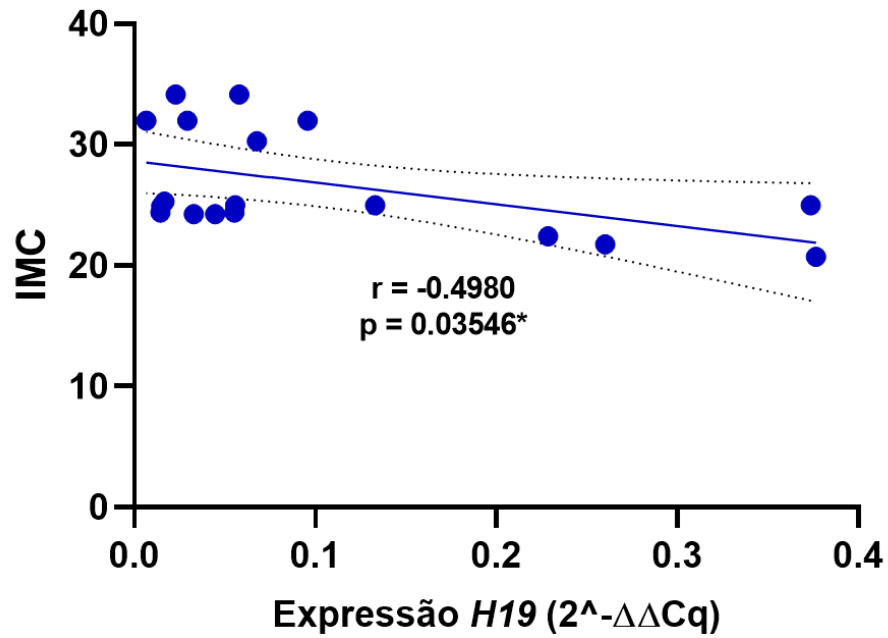
Figura 14 - Expressão de *H19* e *KCNQ1OT1* nos grupos de endometriose superficial e endometrioma/infiltrativa



Fonte: Própria autora, utilizando o GraphPad Prism versão 8.0.1. A) expressão de *H19* obtida nas amostras de endometriose superficial (em azul) e endometrioma/ endometriose infiltrativa (em vermelho) B) expressão de *KCNQ1OT1* obtida nas amostras de endometriose superficial (em azul) e endometrioma/ endometriose infiltrativa (em vermelho).

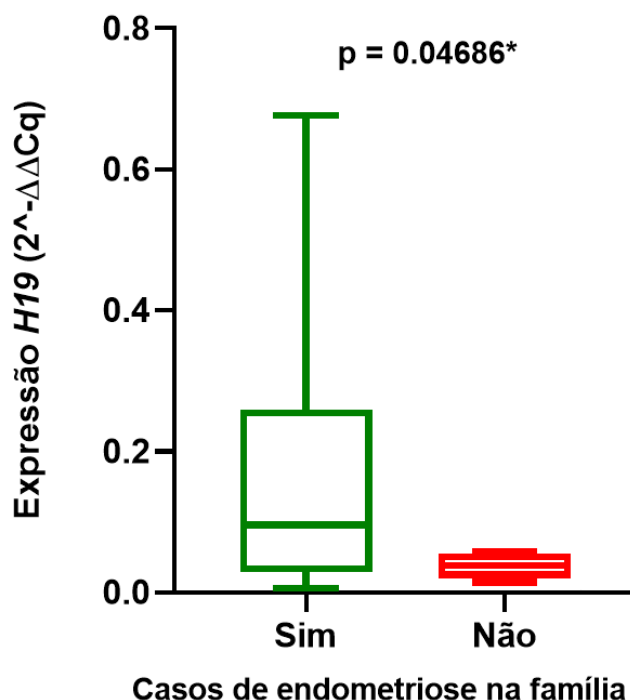
No teste de correlação da expressão dos lncRNAs e a metilação da ICRs, idade e IMC, ocorreu correlação negativa significativa ( $p > 0,05$ ) entre a expressão de *H19* e o IMC (Figura 15). Nas variáveis nominais (uso de medicamentos hormonais, casos na família e paridade) também houve significância entre a expressão de *H19* e a presença de casos na família (Figura 16). Os resultados das análises estão apresentados na Tabela 9.

Figura 15 - Curva de correlação entre o índice de massa corporal (IMC) e a expressão de *H19*



Fonte: Própria autora utilizando o GraphPad Prism versão 8.0.1. Cada ponto em azul da curva de correlação de Pearson representa uma paciente do estudo.

Figura 16 - Relação entre expressão de *H19* e a existência de casos de endometriose na família



Fonte: Própria autora utilizando o GraphPad Prism versão 8.0.1. Expressão de *H19* com a presença de casos de endometriose na família (em verde) e a ausência de casos de endometriose na família (em vermelho).

Tabela 9 - Correlação entre variáveis clínicas e a expressão dos lncRNA *H19* e *KCNQ1OT1*

Variável	Expressão de <i>H19</i>	Expressão de <i>KCNQ1OT1</i>
Metilação da ICR	p= 0,317 r= - 0,022	p= 0,455 r= 0,160
Idade	p= 0,387 r= 0,194	p= 0,824 r= -0,050
IMC	p= 0,035* r= - 0,498	p= 0,485 r= 0,176
Uso de medicamentos hormonais	p= 0,5824	p= 0,8840
Casos na família	p= 0,0469*	p= 0,0502
Paridade	p= 0,4476	p= 0,5652

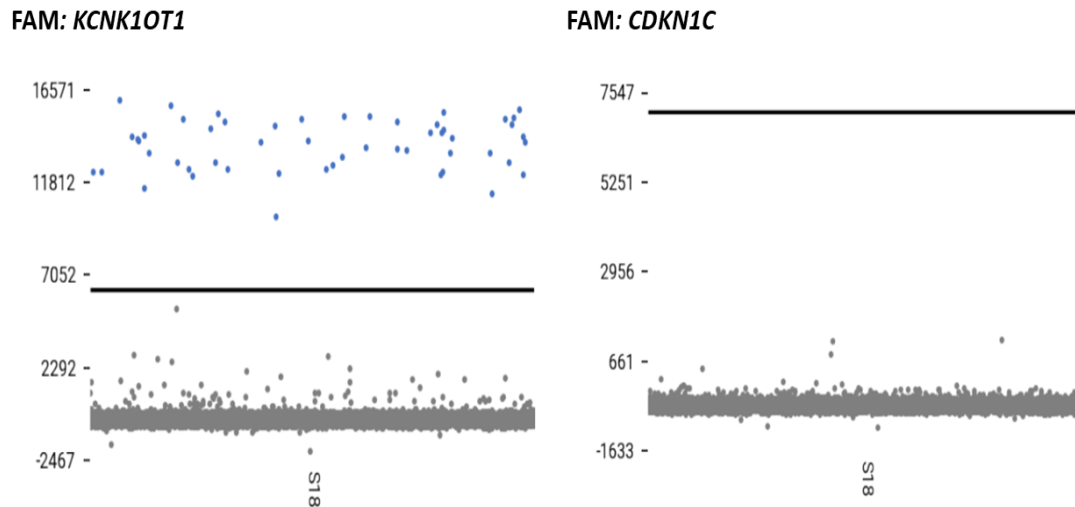
#### 4.4 Quantificação absoluta por dPCR

A quantificação absoluta dos genes *H19* e *IGF2* (ICR1) nas amostras S19 e S24, *KCNQ1OT1* e *CDKN1C* (ICR 2) nas amostras S14 e S18 obtidas por partição em placa através da PCR digital estão descritos na Tabela 10 e nas Figura 17 e 18 abaixo:

Tabela 10 - Quantificação absoluta dos genes obtidas por PCR digital nas amostras analisadas

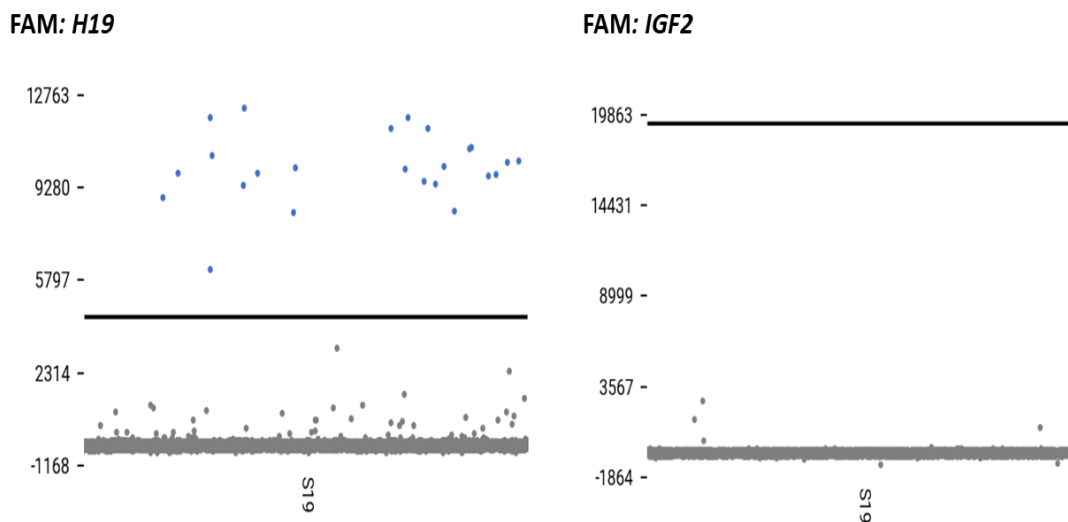
Amostra	Alvo	Cópias/ $\mu$ L	Poços positivos	Total de poços
<b>S14</b>	<i>KCNQ1OT1</i>	41,94	74	20457
	<i>CDKN1C</i>	0	0	20459
<b>S18</b>	<i>KCNQ1OT1</i>	30,03	53	20457
	<i>CDKN1C</i>	0	0	20449
<b>S19</b>	<i>H19</i>	13,58	24	20473
	<i>IGF2</i>	0	0	20460
<b>S24</b>	<i>H19</i>	5,09	9	20465
	<i>IGF2</i>	0	0	20473

Figura 17 - *Dotplot* da quantificação absoluta obtida por partição na dPCR dos genes *KCNQ1OT1* e *CDKN1C* na amostra S18



Legenda: Cada ponto corresponde a uma reação individual da dPCR. A linha preta horizontal representa o limite de fluorescência que separa as partições positivas das negativas. Os pontos azuis são as partições positivas para o gene-alvo, indicando presença do transcrito e os pontos cinza representam as partições negativas, sem amplificação detectável.

Figura 18 - *Dotplot* da quantificação absoluta obtida por partição na dPCR dos genes *H19* e *IGF2* na amostra S19

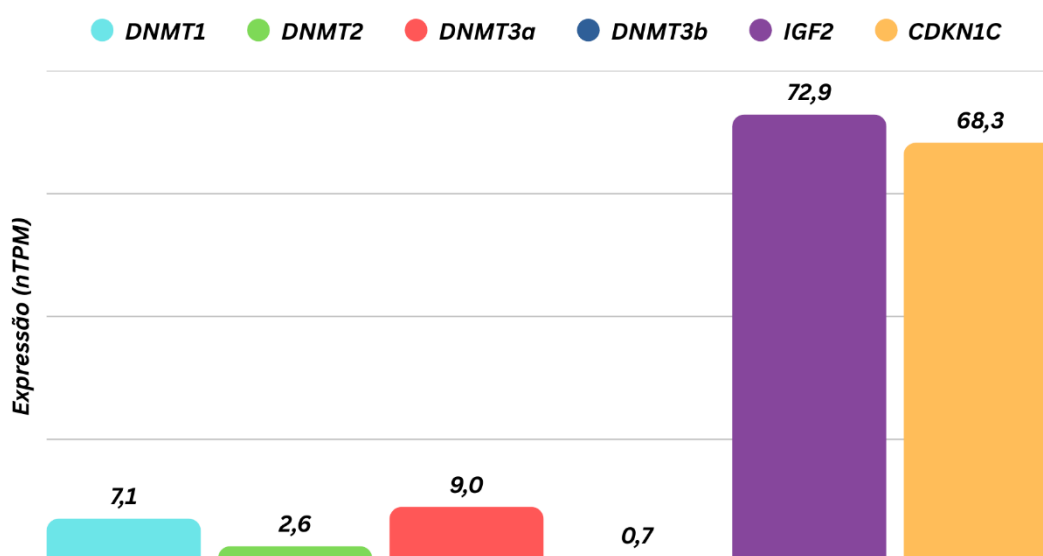


Legenda: Cada ponto corresponde a uma reação individual da dPCR. A linha preta horizontal representa o limite de fluorescência que separa as partições positivas das negativas. Os pontos azuis são as partições positivas para o gene-alvo, indicando presença do transcrito e os pontos cinza representam as partições negativas, sem amplificação detectável.

#### 4.5 PESQUISA EM BANCO DE DADOS PÚBLICOS

A pesquisa da expressão gênica em células endometriais normais para as enzimas DNMTs no HPA demonstrou uma maior expressão de DNMT 3a (9,0 nTPM), seguido de DNMT1 (7,0 nTPM). Além disso, os níveis de *IGF2* e *CDKN1C* são bem elevados: 72,9 e 68,3 nTPM, respectivamente (Figura 19).

Figura 19 - Nível de expressão dos genes DNMTs, *IGF2* e *CDKN1C* em tecido endometrial normal obtido pelo consenso de dados normalizados provenientes do *Human Protein Atlas* (HPA) e *Genotype-Tissue Expression* (GTEx)



Fonte: Própria autora com a ferramenta de desing gráfico online Canva (<https://www.canva.com>). As barras representam a expressão gênica normalizada em transcritos por milhão (nTPM).

A frequência alélica e genotípica da população latino-americana disponível no *Ensembl* foi superior para citosina (0,526) e heterozigose C/T (0,464) no SNP da posição rs2107425 e maior frequência para guanina (0,592) e heterozigose G/T (0,470) no SNP da posição rs2171094 (Tabela 11).

Tabela 11 - Distribuição da frequência genotípica e alélica da população latino-americana dos Polimorfismos de Base Única (SNPs): rs2107425 e rs2071094 disponível no banco de dados *Ensembl*

	Polimorfismo de Base Única (SNP)					
	rs2107425			rs2071094		
	C/C	C/T	T/T	G/G	G/T	T/T
Frequência genotípica	0,294	0,464	0,242	0,357	0,470	0,173
Frequência alélica	C=0,526 / T=0,474			G=0,592 / T=0,408		

O gene *H19* possui somente cinco mutações de fusão do tipo variante de significado incerto (VUS, do inglês *Variant of Uncertain Significance*) descritas para o câncer, sendo nenhuma delas considerada *hotspot* descritos no cBioPortal com os dados do TCGA Pan-Cancer Atlas (Tabela 12).

Tabela 12 - Mutações do gene *H19* descritas no cBioPortal com os dados do TCGA Pan-Cancer Atlas

Mutações VUS – Gene <i>H19</i>	
Tipo de Câncer	Mudança na proteína
Carcinoma hepatocelular	<i>AGT-H19 Fusion</i>
Carcinoma hepatocelular	<i>CLU-H19 Fusion</i>
Carcinoma hepatocelular	<i>FTL-H19 Fusion</i>
Carcinoma hepatocelular	<i>TCIRG1-H19 Fusion</i>
Carcinoma urotelial de bexiga	<i>B4GALT4-H19 Fusion</i>

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesta tese contribuem para ampliar o conhecimento acerca dos padrões de metilação das ICRs localizadas no cromossomo 11, assim como a expressão dos lncRNAs *H19* e *KCNQ1OT1* na endometriose. Por se tratar de uma doença multifatorial, bastante heterogênea e subestimada como um problema de saúde pública, é fundamental continuar a explorar os meios de participação da epigenética na fisiopatologia da doença, com finalidade de auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas, prognósticas e terapêuticas.

Considerando os resultados demográficos obtidos, observou-se que a idade média das pacientes foi de 33,5 anos. Esse dado está em conformidade ao descrito na literatura, no qual a endometriose afeta mulheres em idade reprodutiva, sendo o pico de incidência da doença entre 25 a 34 anos (SHAFRIR et al., 2018b; VIGANÒ et al., 2004). A idade média de paciente acima de 30 anos também foi encontrada em trabalhos anteriores, sendo até apontado como um fator de risco para o desenvolvimento da doença ao comparar-se com mulheres em idade de 25 a 29 anos (NARDONE et al., 2015; ESKENAZI & WARNER, 1997.; KULP et al., 2016; TAHERMANESH et al., 2023). Essa média de idade é associada a fatores socioeconômicos, refletido também em outras características apresentadas neste estudo: maior presença de pacientes casadas (53,3%), moradoras na capital do estado (60%) e com vínculos empregatícios (85,7%). Pacientes nessa faixa etária tendem a ignorar menos os seus sintomas e possuem um maior acesso a serviços de saúde do que pacientes mais jovens (PARAZZINI et al., 2017).

Com relação a obesidade, o maior número de pacientes com endometriose com IMC dentro da normalidade (66,7%) é concordante com o descrito em outros trabalhos, no qual existe uma relação inversa entre o IMC e a prevalência de endometriose. Além disso, baixo IMC é considerado como possível fator de risco para a doença (CHAPRON et al., 2019; NARDONE et al., 2015; PANTELIS et al., 2021; SHAFRIR et al., 2018; VIGANÒ et al., 2004). Essa relação pode ser contraditória, pois já foi identificado que o nível elevado de estradiol na endometriose é resultado tanto de uma maior produção a partir do colesterol quanto de uma maior liberação pelo tecido adiposo (MONNIN et al.,

2023). Assim, o excesso de gordura corporal favoreceria a síntese de estradiol. Uma das explicações para essa contradição pode estar relacionada novamente a fatores socioeconômicos: mulheres com acesso mais fácil a serviços médicos normalmente também possuem maiores taxas de acesso a dietas equilibradas e a prática de exercícios físicos regulares. Entretanto, também se especula que o uso exclusivo do IMC como parâmetro para obesidade não seja o ideal (PARASAR et al., 2017; PARAZZINI et al., 2017; PANTELIS et al., 2021).

A correlação inversa significativa entre IMC e a expressão de *H19* verificada neste estudo sugere um possível mecanismo biológico para explicar essa aparente contradição entre a ausência de obesidade e a ocorrência de endometriose. Em estudo de 2018, observou-se que camundongos com alta expressão de *H19* no tecido adiposo marrom possuíam proteção contra a obesidade induzida por dieta. O lncRNA *H19* é responsável pelo controle da expressão dos genes *IGF2*, *PEG3* e *DLK1*, os quais estão envolvidos no metabolismo energético dos adipócitos (SCHMIDT et al., 2018) e pela diminuição da disponibilidade de HDAC 4, HDAC 5 e HDAC 6, envolvidas na adipogênese, através da regulação realizada pelo miR-675 (HUANG et al., 2016).

A sintomatologia das pacientes analisadas mostrou que a dor pélvica, na forma de dismenorreia, dispáureia e cólicas, é o sintoma mais comum da endometriose, conforme descrito na literatura (GIUDICE e KAO, 2004, ZONDERVAN et al., 2020). A dismenorreia, mencionadas por 50% das pacientes, é considerada a dor mais prevalente entre as dores pélvicas crônicas e, apesar da intensidade da dor sofrer uma redução com o aumento da idade, a dor crônica forte e incapacitante característica da endometriose leva à procura médica (COMPTOUR et al., 2024; LIU e GUO, 2008). Apesar da infertilidade afetar em torno de 30 a 50% das mulheres com endometriose (MAGGIORE et al., 2024; TAYLOR et al., 2021), somente duas pacientes a descreveram neste estudo. Porém, vale ressaltar que a grande maioria das participantes utilizavam algum medicamento hormonal contraceptivo no momento da videolaparoscopia, interferindo, portanto, na possibilidade de uma gravidez.

A localização das lesões coletadas enfatiza o conceito da menstruação retrógrada na etiologia da doença por conta da proximidade com o endométrio. O septo retovaginal foi o local de origem de 45,8% das lesões analisadas, estando também de acordo com o relatado anteriormente. A área pélvica é o

local com mais presença de tecido endometrial ectópico e 69,2% dos casos estão presentes na região retrocervical ou ligamentos, acompanhados de dor severa e dispareunia (FOTI et al., 2018). Outra informação da literatura concordante com esse dado apresentado é que os locais mais frequentes de endometriose infiltrativa são o ligamento uterossacro e o septo retovaginal (NISENBLAT et al., 2016). Uma mesma paciente pode apresentar lesões com classificações diferentes concomitantemente (ALLAIRE et al., 2023; WANG et al., 2022) e seis pacientes estudadas com lesões no septo retrovaginal também possuíam lesões em outras locais da pelve. O desenvolvimento das lesões da endometriose é temporalmente distinto e nem sempre tem aumento gradativo dos sintomas e lesões (COMPTOUR et al., 2024; ZONDERVAN et al., 2020).

O sequenciamento por bissulfito é considerado o padrão-ouro para a análise de metilação do DNA em resolução de base única. Entretanto, o tratamento químico necessário para conversão das citosinas não metiladas em uracila pode levar à degradação significativa do DNA e cobertura desigual entre amostras (OLOVA et al. 2018). Esse fator pode ter contribuído para a baixa geração de reads observada neste estudo para a amostra S12, tanto na análise da H19DMR quanto da KvDMR1. Dessa forma, a inclusão de réplicas técnicas em ensaios futuros poderá auxiliar na avaliação de possíveis falhas ocorridas durante a preparação da biblioteca ou indicar se os achados refletem uma característica intrínseca da amostra.

A perda de *imprinting* (*loss of imprinting* ou LOI) resultante da alteração da metilação de ICRs ocasiona a expressão de ambos os alelos ou silenciamento total dos genes controlados pela região. No que diz respeito às duas ICRs localizadas no cromossomo 11, LOI é associado a doenças genéticas de desenvolvimento, como Síndrome de Beckwith-Wiedemann e Síndrome de Silver-Russell, assim como alguns tipos de câncer, tais quais nefroblastoma (tumor de Wilms), hepatoblastoma e neuroblastoma (ACOSTA-FERNÁNDEZ et al., 2022; CORREA et al., 2020; LU et al., 2020).

Não foi observada relação estatisticamente significativa na metilação das regiões de *imprinting* 1 e 2 do cromossomo 11 entre as lesões superficiais e as lesões de endometrioma/ infiltrativa neste estudo. Porém, ao considerar que o nível de metilação de ICRs é esperado estar em torno de 50%: 100% metilado no alelo de um progenitor e 0% metilado no alelo do outro progenitor, destaca-

se a hipermetilação (metilação superior a 65%) da KvDMR em duas das amostras analisadas assim como a hipometilação (metilação inferior a 35%) da H19DMR observada em três amostras.

O nível de metilação nas ICRs dessas amostras pode estar relacionado com a alteração na expressão de DNMTs descrito na endometriose. Existem algumas divergências nos achados dos estudos, provavelmente devido à padrões de coleta diferentes nos trabalhos, mas foi identificado um aumento de DNMT1, DNMT3a e DNMT3b em tecido ectópico endometrial comparado com amostras controle assim como menor expressão de DNMT1 em tecido ectópico e eutópico do que no endométrio de mulheres sem a doença (Van Kaam et al., 2011; Wu et al., 2007). Além disso, os hormônios estradiol e progesterona modulam a expressão das DNA metiltransferases (DNMTs), promovendo sua redução no endométrio tanto na fase proliferativa quanto na fase secretória. Essa diminuição da atividade enzimática favorece alterações na metilação do DNA e, conseqüentemente, na expressão gênica endometrial (YAMAGATA et al., 2009).

A utilização de fármacos hormonais, como os contraceptivos combinados ou progestagênio de segunda e terceira geração, pode contribuir para modificações nos padrões de metilação das DMRs, alterando seu controle epigenético. Dessa forma, modificações na metilação das regiões analisadas, por exemplo, potencialmente induzida por alterações na atividade das DNMTs, pode levar à expressão aumentada e/ou à repressão de genes com funções importantes na proliferação celular, diferenciação, resposta à inflamação e manutenção do ambiente endometrial presentes nessas regiões analisadas.

As células endometriais possuem um comportamento similar a células tumorais no que diz respeito à proliferação descontrolada e a ocorrências de alterações genéticas/epigenéticas (SMOLARZ et al., 2024). Em estudo realizado em 2015, verificou-se uma associação entre o aumento da metilação da KvDMR1 e o risco para desenvolvimento de um tipo de carcinoma não-invasivo de mama (HARRISON et al., 2015). As alterações na metilação da KvDMR1 modificam a expressão de genes envolvidos na regulação do crescimento celular, como os supressores tumorais *CDKN1C*, *PHLDA2* e *SLC22A18*. A hipermetilação da ICR2, que está localizada no promotor do gene *KCNQ1OT1* e preferencialmente metilada no gene materno, promoveria um aumento na expressão dos genes supressores tumorais, o que supostamente poderia indicar

um ambiente menos propício para a expansão celular desenfreada. Em trabalhos prévios com alguns tipos de células neoplásicas, verificou-se que a diminuição da expressão dos genes *CDKN1C* e *SLC22A18* é um indicativo desfavorável (CHU et al., 2011; JUNG et al., 2015; KAVANAGH e JOSEPH, 2011; QIU et al., 2018; RODRIGUEZ et al., 2011). Com relação ao gene *PHLDA2*, estudo demonstrou que uma alta expressão é relacionado a inibição da apoptose celular via PI3K/AKT, mas associado a hipometilação do DNA (ZHAO et al., 2024).

Na endometriose, a hipermetilação já foi caracterizada em dois genes: 1- próxima ao promotor do *GATA2* nas células endometriais ectópicas, o qual acredita-se ser responsável por promover a desregulação dos receptores de estrogênio, alteração no metabolismo de esteroides e resistência à progesterona (DYSON et al., 2014); 2- próxima ao promotor do *HOXA10* nas células endometriais eutópicas e ectópicas na fase secretória do ciclo, influenciada pela desregulação hormonal de progesterona, levando a proliferação celular e inflamação (MISHRA e MODI, 2024; WU et al., 2005; ZANATTA et al., 2010).

Apesar de não ter sido encontrado diferença da expressão do lncRNA *KCNQ1OT1* entre os grupos analisados neste trabalho, esse RNA não codificador já foi relacionado com potencial oncogênico, afetando proliferação celular, invasão, metástase, metabolismo de glicose e evasão imune (CAGLE et al., 2021). O hormônio estrógeno tem a capacidade de aumentar a expressão de *KCNQ1OT1*, o qual atua no núcleo e promove o silenciamento gênico dos genes diferencialmente expressos no alelo materno da ICR2 do cromossomo 11. Acredita-se que esse processo possa acontecer por meio do seu acúmulo na região de cluster do gene *KCNQ1*, recrutando a proteínas repressoras transcricionais, como a PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) do complexo de remodelação da cromatina e a HDAC1, enzima responsável pela desacetilação de histona (RODRIGUEZ et al., 2011; SUNAMURA et al., 2016; WANG e CHANG, 2011). Assim, como a endometriose é caracterizada pela dependência de estrogênio, o mecanismo de ação do *KCNQ1OT1* pode, potencialmente, ser aplicado à sua fisiopatologia.

De maneira análoga, a hipometilação da H19DMR alteraria a expressão dos genes *IGF2* e *H19*. Esta tendência de metilação na H19DMR é similar ao achado de Kamrani e colaboradores, os quais observaram em 2022, através da

análise de metilação com ChIP para a proteína MeCP2 (proteína 2 de ligação ao metil-CpG) em amostras ectópicas de endometriose, uma hipometilação próxima da significância quando comparado com controles (KAMRANI et al., 2022). A perda de metilação desta ICR também já foi identificada na Síndrome de Silver-Russell por exemplo, na qual aproximadamente 60% dos casos possuem hipometilação de H19DMR e, o mesmo padrão já foi observado em placentas provenientes de gravidez com restrição no crescimento fetal (KOUKOURA et al., 2012; WAKELING et al., 2010).

O gene *H19* tem sua expressão tecidual reduzida em adultos e mudanças no padrão de expressão, ou seja, uma alta expressão já foram associados aos mecanismos de tumorigênese, além de metástase, fuga da morte celular e de resistência à quimioterapia em câncer (HASHEMI et al., 2022; WANG et al., 2023; XIA et al., 2024). Ausência de mutações recorrentes significativas no gene *H19* no câncer demonstra que o mecanismo principal de atuação deste lncRNA no descontrole de crescimento celular é através de alterações epigenéticas. Dessa forma, o *H19* pode atuar das seguintes maneiras: 1) sendo um competidor endógeno de miRNA, isto é, ligando a essas estruturas e as impedindo de atuar a nível celular; 2) como fonte de miRNA, mais precisamente, de miR-675, o qual está presente no primeiro éxon do gene *H19* e 3) interagindo com proteínas de remodelamento da cromatina, como o MBD1 e o complexo PRC2. Além disso, especula-se que haja uma relação indireta com a supressão do gene *CDKN1C*, pertencente ao cluster da outra ICR do cromossomo 11 (CHOWDHURY et al., 2023; RAVEH et al., 2015).

A correlação entre maior expressão de *H19* nas amostras provenientes das mulheres com presença de casos de endometriose na família fortalece o conceito que, além de uma contribuição genética já descrita anteriormente em parente de primeiro grau (TAYLOR et al., 2021), os padrões epigenéticos aberrantes, como a desregulação de *H19*, podem ser transmitidas entre gerações e contribuir para a predisposição à doença. Considerando que apenas no alelo materno o gene *H19* é expresso, a associação encontrada neste estudo sugere que a herança epigenética materna pode estar envolvida na susceptibilidade à endometriose.

Em relação aos SNPs rs2107425 e rs2071094, a maior frequência de heterozigotos contribui para a validação dos resultados de metilação, uma vez

que indica que as leituras de sequenciamento analisadas têm origem parental distinta. Ou seja, as leituras que apresentam alelos diferentes (citosina ou timina; guanina ou timina) refletem a herança do progenitor materno ou paterno. Com base nos dados disponíveis no banco de dados *Ensembl*, os resultados são similares ao obtido nas pacientes deste estudo, no qual a frequência dos alelos citosina e guanina foram ligeiramente superiores a frequência de timina assim como a frequência de heterozigose na população latino-americana. Em 2016, um estudo de metanálise observou a associação entre a presença do alelo T e o menor risco de desenvolvimento de câncer, como o de mama e de ovário, mas sem significância estatística (CHU et al., 2016) assim como não houve significância entre a metilação da H19DMR e os SNPs rs2107425 e rs2071094 no câncer de pênis (SANTOS et al., 2024).

Não foi possível observar diferença significativa na expressão de *H19* nas amostras analisadas, mas pesquisas prévias demonstraram uma redução relevante na sua expressão em lesões eutópicas e ectópicas de endometriose comparado com amostras controle (KAMRANI et al., 2022; SZAFLIK et al., 2022). Entretanto, o contrário, ou seja, um aumento na expressão de *H19* nas células endometriais também foi observado anteriormente (LIU et al., 2020). Em 2022, nosso grupo de pesquisa verificou, em pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD) e com leucemia mieloide aguda (LMA) secundária, uma diminuição na expressão deste lncRNA, estando o aumento da expressão associado ao baixo risco prognóstico (BORGES et al., 2022).

Sabe-se que o número de sítios de ligação disponíveis na região de ICR1 no genoma humano influencia diretamente a eficiência de ligação da CTCF, cuja função é essencial para a regulação do *imprinting* genômico (FRESCHI et al., 2021). Assim, alterações no padrão de metilação desta região podem comprometer a ligação da CTCF e afetar a regulação monoalélica da ICR1. Nesse trabalho, foi observado que a posição CpG1 apresentou padrão hipermetilado, enquanto a posição CpG17 hipometilada na maioria das amostras analisadas, o que pode interferir no controle da expressão gênica e na expressão de *IGF2* e *H19* dessas amostras, favorecendo ou não a ligação da proteína CTCF.

Embora os dados públicos obtidos no HPA apontem uma alta expressão dos genes *IGF2* e *CDKN1C* no tecido endometrial normal, a ausência de

quantificação absoluta destes genes associados à detecção dos lncRNAs *H19* e *KCNQ1OT1* nas amostras de endometriose analisadas por dPCR pode indicar uma possível alteração nos mecanismos epigenéticos relacionados ao *imprinting* genômico das ICRs do cromossomo 11. Essa expressão não detectável pode ser atribuída à ação regulatória gênica em *cis* dos lncRNAs sobre os genes do mesmo cluster, ou seja, a expressão de *H19* e *KCNQ1OT1* nas amostras de endometriose poderia estar exercendo um efeito repressivo sobre *IGF2* e *CDKN1C*, respectivamente.

A ausência de um número amostral maior ou falta de um grupo controle (células endometriais provenientes de pacientes sem a doença) podem ter impactado na significância dos resultados obtidos. Ainda, a própria heterogeneidade da endometriose, como o tipo de tecido (eutópico e ectópico), as células (estroma e glandulares) analisadas e da fase do ciclo menstrual no momento da coleta do material podem gerar diferenças e dificultar a comparação entre os trabalhos (SAARE et al., 2018).

É importante considerar a possibilidade de uma relação temporal na inibição gênica observada, principalmente considerando a natureza hormônio-dependente, inflamatória e crônica da endometriose (SZUKIEWICZ et al., 2021). Assim, a exposição contínua a esses estímulos pode promover um acúmulo progressivo de alterações epigenéticas, resultando em silenciamento nesses genes regulados por *imprinting* genômico.

Vale ressaltar que as modificações epigenéticas são reversíveis e influenciadas pelo histórico biológico, ambiental e comportamental ao qual o indivíduo é exposto ao longo da vida (WU et al., 2005). Embora neste estudo não tenha sido observada uma clara relação entre a metilação e a expressão gênica dos lncRNAs dessas ICRs nos grupos analisados, destaca-se a importância de aprofundar a investigação dos padrões epigenéticos envolvidos na endometriose, considerando sua possível contribuição para a progressão da doença e sua heterogeneidade clínica.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho permitiram observar de forma preliminar o padrão de metilação das ICRs do cromossomo 11 na endometriose.

Verificou-se a hipometilação na H19DMR em três amostras e a hipermetilação na KvDMR1 em duas amostras analisadas, sugerindo possíveis desequilíbrios na regulação epigenética dessas regiões. Embora não tenha sido observada diferença significativa na expressão dos lncRNA dessas regiões, a expressão do gene *H19* apresentou uma relação significativa com a existência de casos prévios da doença na família, assim como com valores de IMC dentro da faixa de normalidade. Os dados dos SNPs obtidos se mostraram consistentes com as informações populacionais latino-americana tanto com relação a frequência dos alelos quanto a distribuição da heterozigose.

Dessa forma, os dados apresentados reforçam a necessidade de investigações adicionais direcionadas para a análise da relação entre as modificações epigenéticas de *imprinting* genômico e seu possível papel na fisiopatologia da endometriose.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA-FERNÁNDEZ, E., et al. Usefulness of the MS-MLPA technique in the diagnosis of Beckwith-Wiedemann syndrome and Silver-Russell syndrome. *Gaceta Medica de Mexico*, v.158, n.4, p. 210–218, 2022. <https://doi.org/10.24875/GMM.22000029>
- AHN, S. H., SINGH, V., TAYADE, C. Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities. *Fertility and Sterility*, v. 107, n. 3, p. 523–532, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.01.009>
- ALLAIRE, C., BEDAIWY, M. A., YONG, P. J. Diagnosis and management of endometriosis. *Canadian Medical Association Journal*, v. 195, n. 10, p. 363–371, 2023. <https://doi.org/10.1503/cmaj.220637>
- American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *American Society for Reproductive Medicine*, 1997.
- ANGELONI, A., BOGDANOVIC, O. Enhancer DNA methylation: implications for gene regulation. *Essays In Biochemistry*, v. 63, n.6, p. 707-715, 2019. <https://doi.org/10.1042/ebc20190030>
- BARLOW, D. P., BARTOLOMEI, M. S. Genomic Imprinting in Mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v.6, n.2, 2014.
- BARTOLOMEI, M. S., OAKEY, R. J., WUTZ, A. Genomic imprinting: An epigenetic regulatory system. *PLoS Genetics*, v.16, n. 8, 2020. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1008970>
- BHASKARAN, M., MOHAN, M. MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. *Veterinary Pathology*, v. 51, n. 4, 759–774, 2014. <https://doi.org/10.1177/0300985813502820>
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- BORGES. D. P. **O papel do RNA longo não codificante H19 no desenvolvimento da síndrome mielodisplásica**. 2022. Tese (Doutorado em Ciências Médicas). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/66895>.
- BORRELLI, G. M., CARVALHO, K. I., KALLAS, E. G., et al. Chemokines in the pathogenesis of endometriosis and infertility. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 98, 1–9, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2013.03.003>
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Endometriose: atendimentos na atenção primária do SUS crescem 76,2% em três anos e impulsionam debate*. 11 de março de 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt->

[br/assuntos/noticias/2025/marco/endometriose-atendimentos-na-atencao-primaria-do-sus-crescem-76-2-em-tres-anos-e-impulsionam-debate](https://br/assuntos/noticias/2025/marco/endometriose-atendimentos-na-atencao-primaria-do-sus-crescem-76-2-em-tres-anos-e-impulsionam-debate)

BRASIL. Ministério da Saúde. *Endometriose: uma a cada 10 mulheres sofre com os sintomas*. 15 de março de 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/marco/endometriose-uma-a-cada-10-mulheres-sofre-com-os-sintomas>

BULUN, S. E., et al. Endometriosis. *Endocrine Reviews*, v. 40, n. 4, p. 1048–1079, 2019. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00242>

BURNEY, R. O., GIUDICE, L. C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and Sterility*, v.98, n. 3, p. 511–519, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.029>

CAGLE, P., QI, Q., NITURE, S., KUMAR, D. Kcnq1ot1: An oncogenic long noncoding rna. *Biomolecules*, v. 11, n. 11, 2021. <https://doi.org/10.3390/biom11111602>

CAPEZZUOLI, T. et al. Classification/staging systems for endometriosis: the state of the art. *Gynecological and Reproductive Endocrinology and Metabolism*, v. 1, n. 1, p. 14-22, 2020.

CERAMI, E., et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discovery*, v. 2, n. 5, p. 401-404, 2012. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095

CHAPRON, C., et al. Rethinking mechanisms, diagnosis and management of endometriosis. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 15, n. 11, p. 666–682, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0245-z>

CHOWDHURY, P. R., et al. H19: An Oncogenic Long Non-coding RNA in Colorectal Cancer. *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE*, v. 96, 2023.

CHU, S. H., et al. Promoter methylation and downregulation of SLC22A18 are associated with the development and progression of human glioma. *Journal of Translational Medicine*, v. 9, n.1, 2011. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-156>

CHU, M., et al. Quantitative assessment of polymorphisms in H19 lncRNA and cancer risk: a meta-analysis of 13,392 cases and 18,893 controls. *Oncotarget*, v. 7, n. 48, p. 78 631–78 639, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.12530.

COMPTOUR, A., et al. Endometriosis: Age at diagnosis and the severity of the disease. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, v. 53, n.5, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2024.102759>

CORREA, A. R. E., et al. Epigenetic Abnormalities of 11p15.5 Region in Beckwith-Wiedemann Syndrome - A Report of Eight Indian Cases. *Indian Journal of Pediatrics*, v. 87, n. 3, p. 175–178, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12098-019-03148-3>

- DMOWSKI, W. P., Braun, D. P. Immunology of endometriosis. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v. 18, n. 2, p. 245–263, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2004.02.001>
- DYSON, M. T., et al. Genome-Wide DNA Methylation Analysis Predicts an Epigenetic Switch for GATA Factor Expression in Endometriosis. *PLoS Genetics*, v.10, n. 3, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004158>
- EDWARDS, J. R., et al. DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics and Chromatin*, v. 10, n. 1, p.1–10, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0130-8>
- ESKENAZI, B., WARNER, M. L. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.*, v. 24, n. 2, p. 235-58, 1997. [https://doi:10.1016/s0889-8545\(05\)70302-8](https://doi:10.1016/s0889-8545(05)70302-8)
- FARSETTI, A., ILLI, B., GAETANO, C. How epigenetics impacts on human diseases. *European Journal of Internal Medicine*. v. 114, p. 15–22, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2023.05.036>
- FASSBENDER, A., et al. Update on Biomarkers for the Detection of Endometriosis. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/130854>
- FERGUSON-SMITH, A. C., Bourc'his, D. The discovery and importance of genomic imprinting. *ELife*, 7, 2018. <https://doi.org/10.7554/eLife.42368>
- FESSELE, K. L., & WRIGHT, F. Basics of Epigenetic Control. *Biological Research for Nursing*, v. 20, n. 1, p. 103–110, 2018. <https://doi.org/10.1177/1099800417742967>
- FRESCHI A., et al. The number of the CTCF binding sites of the H19/IGF2:IG-DMR correlates with DNA methylation and expression imprinting in a humanized mouse model. *Hum Mol Genet*, v. 30, n. 16, p 1509-1520, 2021. DOI: [10.1093/hmg/ddab132](https://doi.org/10.1093/hmg/ddab132)
- FOTI, P. V., et al. Endometriosis: clinical features, MR imaging findings and pathologic correlation. In *Insights into Imaging*, v. 9, n. 2, p. 149–172, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13244-017-0591-0>
- FRANÇA, P. R. DE C., LONTRA, A. C. P., FERNANDES, P. D. Endometriosis: A Disease with Few Direct Treatment Options. *Molecules*, v. 27, n.13, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27134034>
- GHAFOURI-FARD, S., ESMAEILI, M., TAHERI, M. H19 lncRNA: Roles in tumorigenesis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v.123, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109774>
- GIUDICE, L. C., KAO, L. C. Endometriosis. *Lancet*, v. 364, n. 9447, p. 1789–1799, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17403-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17403-5)
- GUO, S. W. Epigenetics of endometriosis. *Molecular Human Reproduction*, v. 15, n.10, p. 587–607, 2009. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap064>

HAAS, D., SHEBL, O., SHAMIYEH, A., OPPELT, P. The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: Their strengths and weaknesses. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, v. 92, n. 1, p. 3–7, 2013.

<https://doi.org/10.1111/aogs.12026>

HAIG, D. *The (Dual) Origin of Epigenetics*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. v. 69, p. 67-70, 2004. <https://doi: 10.1101/sqb.2004.69.67>.

HARRISON, K., et al. Breast cancer risk and imprinting methylation in blood. *Clinical Epigenetics*, v. 7, n. 1, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0125-x>

HASHEMI, M., et al. Long non-coding RNA (lncRNA) H19 in human cancer: From proliferation and metastasis to therapy. *Pharmacological Research*, v. 184, 2022. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106418>

HERMAN, J. G., et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 18, p. 9821-9826, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9821>.

HORNE, A. W., MISSMER, S. A. Pathophysiology, diagnosis, and management of endometriosis. *BMJ*, v.14, n. 379, 2022. <https://doi.org/10.1136/bmj-2022-070750>

HOUSHDARAN, S. et al. Aberrant Endometrial DNA Methylome and Associated Gene Expression in Women with Endometriosis. *Biology of Reproduction*, v. 95, n. 5, 2016. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.140434>

HUANG, Y.; ZHENG, Y.; JIN, C.; LI, X.; JIA, L.; LI, W. Long Non-coding RNA H19 Inhibits Adipocyte Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells through Epigenetic Modulation of Histone Deacetylases. *Scientific Reports*, v. 6, art. 28897, 2016. DOI: 10.1038/srep28897

HULL, M. L., NISENBLAT, V. Tissue and circulating microRNA influence reproductive function in endometrial disease. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 27, n. 5, p. 515–529, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.07.012>

INBAR-FEIGENBERG, M, et al. Basic concepts of epigenetics. *Fertility and Sterility*, v. 99, n. 3, p. 607–615, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.117>

IZAWA, M., et al. Epigenetic aberration of gene expression in endometriosis. *Frontiers in Bioscience*, v. 5, 2013.

JABLONKA, E., & LAMM, E. Commentary: The epigenotype-a dynamic network view of development. *International Journal of Epidemiology*, v. 41, n. 1, p. 16–20, 2012. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr185>

JAENISCH, R., & BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, v. 33, n. 3, p. 245–254, 2003. <https://doi.org/10.1038/ng1089>

- JIN, X., FENG, J., CHENG, X. LncRNA IGF2-AS promotes endometriosis progression through targeting miR-370-3p/IGF2 axis and activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 39, n. 12, p. 2699–2710, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02638-2>
- JUNG, Y., et al. Characterization of SLC22A18 as a tumor suppressor and novel biomarker in colorectal cancer. *Oncotarget*, v. 6, n. 28, 2015. [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)
- KAFALI, H., ARTUC, H., & DEMIR, N. Use of CA125 fluctuation during the menstrual cycle as a tool in the clinical diagnosis of endometriosis; a preliminary report. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, v. 116, n.1, p. 85–88, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2004.02.039>
- KAMRANI, S., et al. Altered gene expression of VEGF, IGFs and H19 lncRNA and epigenetic profile of H19-DMR region in endometrial tissues of women with endometriosis. *Reproductive Health*, v. 19, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12978-022-01406-w>
- KAVANAGH, E., & JOSEPH, B. The hallmarks of CDKN1C (p57, KIP2) in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, v. 1816, n.1, p. 50–56, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.03.002>
- KONDO, Y., SHINJO, K., & KATSUSHIMA, K. Long non-coding RNAs as an epigenetic regulator in human cancers. In *Cancer Science*, v. 108, n. 10, p. 1927–1933, 2017. <https://doi.org/10.1111/cas.13342>
- KONINCKX, P. R., et al. Pathogenesis of endometriosis: the genetic/epigenetic theory. *Fertility and Sterility*, v. 111, n. 2, p. 327–340, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.10.013>
- KONRAD, L., et al. Endometriosis in MRKH cases as a proof for the coelomic metaplasia hypothesis?. *Reproduction* v., 158, n. 2, p 41-47, 2019. <https://doi.org/10.1530/REP>
- KOUKOURA, O., SIFAKIS, S., SPANDIDOS, D. A. DNA methylation in the human placenta and fetal growth (review). In *Molecular Medicine Reports*, v. 5, n. 4, p. 883–889, 2012. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.763>
- KULP, J. L., MAMILLAPALLI, R., & TAYLOR, H. S. Aberrant HOXA10 Methylation in Patients with Common Gynecologic Disorders. *Reproductive Sciences*, v. 23, n. 4, p. 455–463, 2016. <https://doi.org/10.1177/1933719116630427>
- LAMCEVA, J., ULJANOVS, R., & STRUMFA, I. The Main Theories on the Pathogenesis of Endometriosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 5, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24054254>
- LEE, S.-Y., KOO, Y.J., LEE, D.H. Classification of endometriosis. *Yeungnam University Journal of Medicine*, v. 38, n. 1, p. 10–18, 2021. <https://doi.org/10.12701/yujm.2020.00444>

- LIU, S., et al. LncRNA H19 Overexpression in Endometriosis and its Utility as a Novel Biomarker for Predicting Recurrence. *Reprod Sci*, v. 27, n. 9, p. 1687-1697, 2020. <https://doi.org/10.1007/s43032-019-00129-x/Published>
- LIU, X., GUO, S. W. Dysmenorrhea: Risk factors in women with endometriosis. *Women's Health*, v. 4, n. 4, p. 399–411, 2008. <https://doi.org/10.2217/17455057.4.4.399>
- LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- LU, M. Y., ET AL. Methylation Statuses of H19DMR and KvDMR at WT2 in Wilms Tumors in Taiwan. *Pathology and Oncology Research*, v. 26, n. 4, p. 2153–2159, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12253-020-00802-6>
- MAGGIORE, U. L. R., et al. Epidemiology of infertility in women with endometriosis. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v. 92, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2023.102454>
- MAJUMDAR, S., SINGH, P., IYER, A. H., SARAVANAN, M. Functional Epigenomics. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Functional Genomics and Metabolic Engineering*, p. 3–26, 2017. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63667-6.00001-8>
- MATTEI, A. L., BAILLY, N., MEISSNER, A. DNA methylation: a historical perspective. *Trends in Genetics*, v. 38, n. 7, p. 676–707, 2022. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2022.03.010>
- MATTICK, J. S., MAKUNIN, I. V. Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics*, v. 15, n. 1, p. 17–29, 2006. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl046>
- MIRANDA FURTADO, C.L., et al. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. *Epigenetics*, v. 14, n.12, p.1164–1176, 2019. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1640546>
- MISHRA, A., MODI, D. Role of HOXA10 in pathologies of the endometrium. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, v. 26, n. 1, p. 81-96, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11154-024-09923-8>
- MISSMER, S. A., et al. Impact of endometriosis on women's life decisions and goal attainment: A cross-sectional survey of members of an online patient community. *BMJ Open*, v. 12, n. 4, 2022. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-052765>
- MONNIN, N., FATTET, A. J., KOSCINSKI, I. Endometriosis: Update of Pathophysiology, (Epi) Genetic and Environmental Involvement. *Biomedicines*, v. 11, n. 3, 2023. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030978>
- MOORE, L. D., LE, T., FAN, G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, v. 38, n.1, p. 23–38, 2013. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>

MOOSAVI, A., ARDEKANI, A. M. Role of epigenetics in biology and human diseases. In *Iranian Biomedical Journal*, v. 20, n. 5, p. 246–258, 2016.

<https://doi.org/10.22045/ibj.2016.01>

MORANGE, M. What history tells us XXXII. the long and tortuous history of epigenetic marks. *Journal of Biosciences*, v. 38, n. 3, p. 451–454, 2013.

<https://doi.org/10.1007/s12038-013-9354-3>

NARDONE, C.C., et al. The role of ovarian fossa evaluation in patients with ovarian endometriosis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v. 292, n. 4, p. 869–873, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3719-9>

NISENBLAT, V., et al. Imaging modalities for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 2, n. 2, 2016.

<https://doi.org/10.1002/14651858.CD009591.pub2>

OLOVA, N., et al. Comparison of whole-genome bisulfite sequencing library preparation strategies identifies sources of biases affecting DNA methylation data. *Genome Biology*, v. 19, n. 1, art. 33, 2018.

PANTELIS, A., MACHAIRIOTIS, N., LAPATSANIS, D. P. The Formidable yet Unresolved Interplay between Endometriosis and Obesity. In *Scientific World Journal*, v.2021, 2021.

<https://doi.org/10.1155/2021/6653677>

PARASAR, P., OZCAN, P., TERRY, K. L. Endometriosis: Epidemiology, Diagnosis and Clinical Management. *Current Obstetrics and Gynecology Reports*, v. 6, n. 1, p. 34–41, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13669-017-0187-1>

PARAZZINI, F., et al. Epidemiology of endometriosis and its comorbidities. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, v. 209, p. 3–7, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.04.021>

PASCOAL, E., ET AL. Strengths and limitations of diagnostic tools for endometriosis and relevance in diagnostic test accuracy research. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, v. 60, n. 3, p. 309–327, 2022.

<https://doi.org/10.1002/uog.24892>

PATEL, B. G., et al. Pathogenesis of endometriosis: Interaction between Endocrine and inflammatory pathways. In *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v. 50, p. 50–56, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.01.006>

PEREIRA, T. C. Visão geral dos ncRNAs na célula. In: PEREIRA, T. C (org). **Introdução ao universo dos non-coding RNAs**. 1ª ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p- 26-27.

PRASANTH, K. V., SPECTOR, D. L. Eukaryotic regulatory RNAs: An answer to the “genome complexity” conundrum. *Genes and Development*, v. 21, n. 1, p. 11–42, 2007.

<https://doi.org/10.1101/gad.1484207>

QIAN, K., et al. Differentiation of endometrial stromal cells in vitro: Down-regulation of suppression of the cell cycle inhibitor p57 by HOXA10? *Molecular*

*Human Reproduction*, v. 11, n. 4, p. 245–251, 2005.

<https://doi.org/10.1093/molehr/gah147>

QIU, Z., et al. Downregulated CDKN1C/p57kip2 drives tumorigenesis and associates with poor overall survival in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 497, n. 1, p. 187–193, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.052>

RAVEH, E., et al. The H19 Long non-coding RNA in cancer initiation, progression and metastasis - a proposed unifying theory. In *Molecular Cancer*, v. 14, n. 1, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0458-2>

REIK, W., DEAN, W., WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, v. 293, n. 5532, p. 1089–1093, 2001.

<https://doi.org/10.1126/science.1063443>

RETIS-RESENDIZ, A. M., et al. The role of epigenetic mechanisms in the regulation of gene expression in the cyclical endometrium. *Clinical Epigenetics*, v. 13, n. 1, 2021. DOI: 10.1186/s13148-021-01103-8.

RODRIGUEZ, B. A. T., et al. Estrogen-mediated epigenetic repression of the imprinted gene cyclin-dependent kinase inhibitor 1C in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, v. 32, n. 6, p. 812–882, 2011.

<https://doi.org/10.1093/carcin/bgr017>

ROLLA, E. Endometriosis: Advances and controversies in classification, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *F1000Research*, v. 8, 2019.

<https://doi.org/10.12688/f1000research.14817.1>

SAARE, M., et al. DNA methylation alterations-potential cause of endometriosis pathogenesis or a reflection of tissue heterogeneity? In *Biology of Reproduction*, v. 99, n. 2, p. 273–282, 2018. Oxford University Press.

<https://doi.org/10.1093/biolre/ioy067>

SALIMINEJAD, K., et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, v. 234, n. 5, p. 5451–5465, 2019. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>

SAMPSON, J. A. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *The American Journal of Pathology*, v. 3, n. 2, p. 93-110.43, 1927.

SANTOS, R. S., et al. Hypomethylation at H19DMR in penile squamous cell carcinoma is not related to HPV infection. *Epigenetics*, v. 19, n. 1, 2024.

<https://doi.org/10.1080/15592294.2024.2305081>

SCHMIDT, E., et al. LincRNA H19 protects from dietary obesity by constraining expression of monoallelic genes in brown fat. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, art. 3622, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-05933-8

- SCHULTZ, B. M., et al. Enhancers compete with a long non-coding RNA for regulation of the Kcnq1 domain. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. 2, p. 745–759, 2015. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1324>
- SHAFRIR, A. L., et al. Risk for and consequences of endometriosis: A critical epidemiologic review. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v. 51, p. 1–15, 2018. Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.06.001>
- SIENA, A. D. D.; BARROS, I. I. RNA longos não codificantes. In: PEREIRA, T. C (org). **Introdução ao universo dos non-coding RNAs**. 1ª ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p- 95-132.
- SIGNORILE, P. G., VICECONTE, R., BALDI, A. New Insights in Pathogenesis of Endometriosis. In *Frontiers in Medicine*, v. 9, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.879015>
- SMOLARZ, B., et al. Analysis of VEGF, IGF1/2 and the Long Noncoding RNA (lncRNA) H19 Expression in Polish Women with Endometriosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 10, 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25105271>
- SOTO, D., et al. Endometriosis biomarkers of the disease: An update. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, v. 34, n. 4, p. 210–219, 2022. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000798>
- STAMPONE, E., et al. Genetic and epigenetic control of CDKN1C expression: Importance in cell commitment and differentiation, tissue homeostasis and human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 4, 2018. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19041055>
- STATELLO, L., et al. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v 22, p. 96–118 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
- SUNAMURA, N., et al. Regulation of functional KCNQ1OT1 lncRNA by  $\beta$ -catenin. *Scientific Reports*, v. 6, n. 20690, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep20690>
- SYMONS, L. K., et al. The Immunopathophysiology of Endometriosis. *Trends in Molecular Medicine*, v. 24, n. 9, p. 748–762, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.07.004>
- SZAFLIK, T., et al. Analysis of Long Non-Coding RNA (lncRNA) UCA1, MALAT1, TC0101441, and H19 Expression in Endometriosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 19, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms231911583>
- SZUKIEWICZ, D., et al. Estrogen- and Progesterone (P4)-Mediated Epigenetic Modifications of Endometrial Stromal Cells (EnSCs) and/or Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs) in the Etiopathogenesis of Endometriosis. *Stem*

*Cell Reviews and Reports*, v. 17, p. 1094-1113, 2021. DOI: 10.1007/s12015-020-10115-5.

SWETA S., et al. Importance of Long Non-coding RNAs in the Development and Disease of Skeletal Muscle and Cardiovascular Lineages. *Front Cell Dev Biol*, v. 7, n. 228, 2019. doi: 10.3389/fcell.2019.00228.

TAHERMANESH, K., et al. Evaluation of expression of biomarkers of PLAGL1 (ZAC1), microRNA, and their non-coding RNAs in patients with endometriosis. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, v. 52, n. 4, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2023.102568>

TAYLOR, H. S., KOTLYAR, A. M., FLORES, V. A. Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges and novel innovations. *Lancet*, v. 397, n. 10276, p. 839-852, 2021.

TUCCI, V., et al. Genomic Imprinting and Physiological Processes in Mammals. *Cell*, v. 176, n. 5, p. 952–965, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.043>

van KAAM, K. J. A. F., et al. Deoxyribonucleic acid methyltransferases and methyl-CpG-binding domain proteins in human endometrium and endometriosis. *Fertility and Sterility*, v. 95, n. 4, p. 1421–1427, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.01.031>

van LEEUWEN, F., van STEENSEL, B. Histone modifications: From genome-wide maps to functional insights. *Genome Biology*, v. 6, n. 6, 2005. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-6-113>

VIGANÒ, P., et al. Endometriosis: Epidemiology and aetiological factors. In *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v. 18, n. 2, p. 177–200, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2004.01.007>

WAKELING, E. L., et al. Epigenotype-phenotype correlations in Silver-Russell syndrome. *Journal of Medical Genetics*, v. 47, n.11, p. 760–768, 2010. <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.079111>

WANG, K. C., CHANG, H. Y. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Molecular Cell*, v. 43, n. 6, p. 904–914, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.018>

WANG, P. H., et al. Endometriosis: Part I. Basic concept. In *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 61, n. 6, p. 927–934, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2022.08.002>

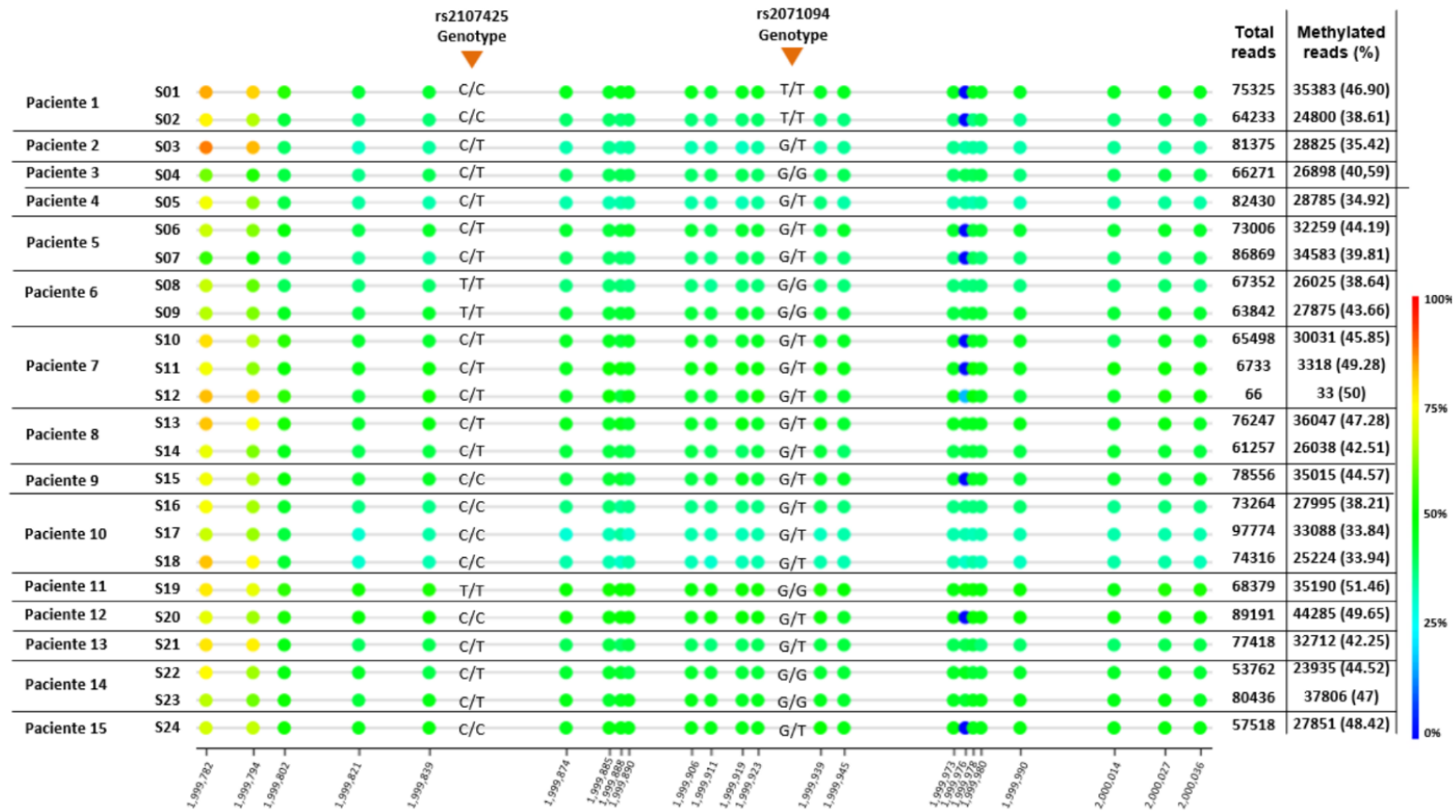
WANG, X., et al. The Abundance and Function of Neutrophils in the Endometriosis Systemic and Pelvic Microenvironment. *Mediators of Inflammation*, v. 2023, p. 1481-1489, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/1481489>

WANG, Y., et al. Long Noncoding RNA H19: A Novel Oncogene in Liver Cancer. In *Non-coding RNA*, v. 9, n. 2, 2023. <https://doi.org/10.3390/ncrna9020019>

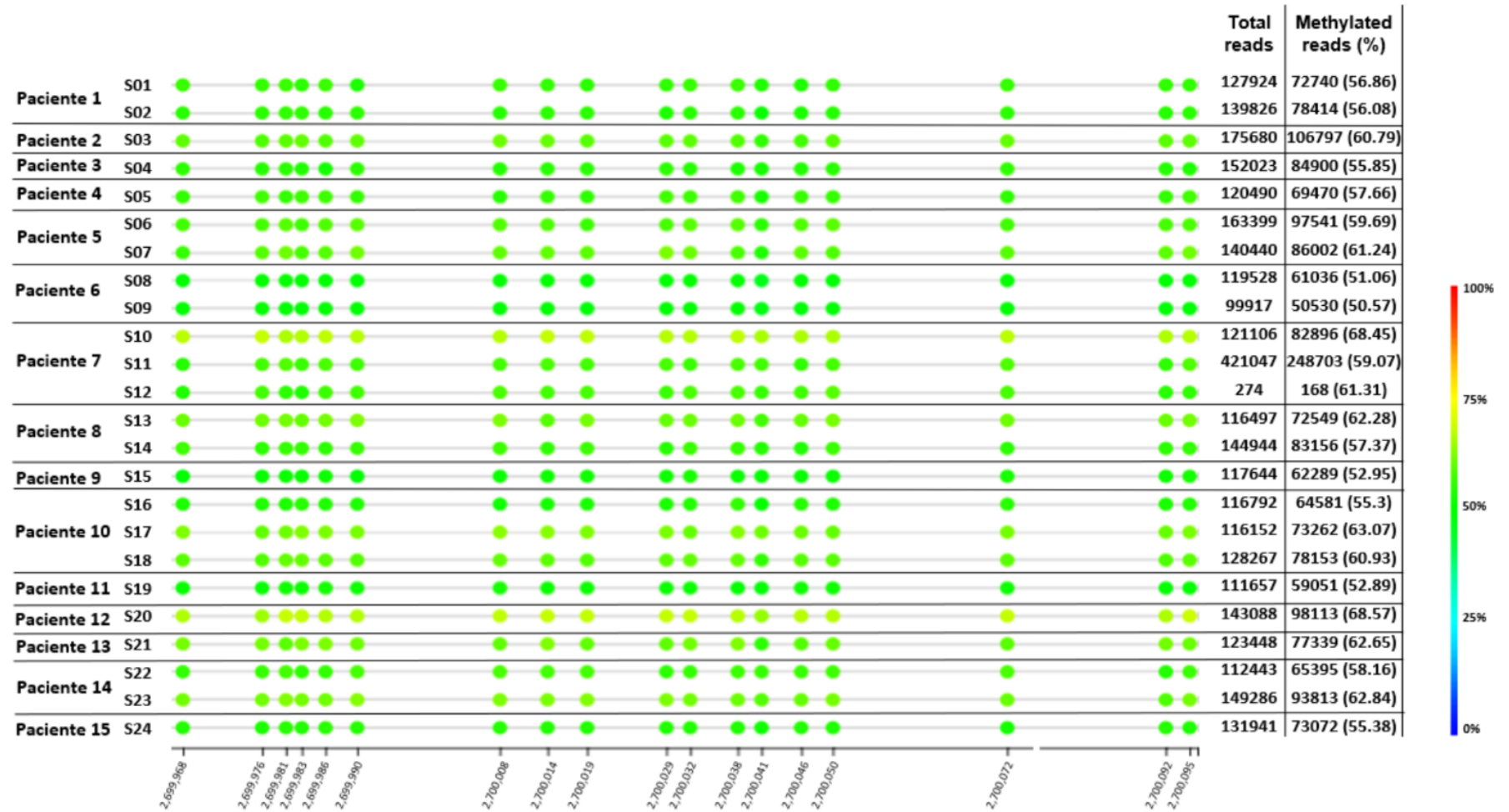
- WEKSBERG, R., SHUMAN, C., BECKWITH, J. B. Beckwith-Wiedemann syndrome. *European Journal of Human Genetics*, v. 18, n. 1, p. 8–14, 2010. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.106>
- WHO. **Endometriosis**. 24 de março de 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/endometriosis>
- WU, X., ZHANG, Y. TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond. *Nature Reviews Genetics*, v. 18, n. 9, p. 517–534, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>
- WU, Y., et al. Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 193, n. 2, p. 371–380, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.01.034>
- WU, Y., et al. Aberrant expression of deoxyribonucleic acid methyltransferases DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, v. 87, n. 1, p. 24–32, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.05.077>
- YAMAGATA, Y. et al. DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and estrogen. *Human Reproduction*, Oxford, v. 24, n. 5, p. 1126–1132, 2009. <https://academic.oup.com/humrep/article/24/5/1126/713948>
- XIA, Y., et al. Long noncoding RNA H19: functions and mechanisms in regulating programmed cell death in cancer. *Cell Death Discovery*, v. 10, n. 1, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-01832-8>
- XUE, Q., et al. Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium and endometriosis. *Biology of Reproduction*, v. 77, n. 4, p. 681–687, 2007a. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.061804>
- XUE, Q., et al. Transcriptional activation of steroidogenic factor-1 by hypomethylation of the 5' CpG island in endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 92, n. 8, p. 3261–3267, 2007b. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0494>
- ZANATTA, A., et al. The role of the Hoxa10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis and its related infertility: A review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 27, n. 12, p. 701–710, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9471-y>
- ZHAO, J., et al. Epigenetic modification of PHLDA2 is associated with tumor microenvironment and unfavorable outcome of immune checkpoint inhibitor-based therapies in clear cell renal cell carcinoma. *European Journal of Medical Research*, v. 29, n.1, 2024. <https://doi.org/10.1186/s40001-024-01939-9>
- ZONDERVAN, K. T., BECKER, C. M., MISSMER, S. A. Endometriosis. *New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 13, p. 1244–1256, 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1810764>

APÊNDICE A – Padrão de metilação da H19DMR e KvDMR1 dividido por coletas em pacientes participantes do estudo

H19DMR



KvDMR1



## APÊNDICE B – COMPILAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR PACIENTE

Paciente	Amostra	Local de coleta	Reads metiladas H19DMR	Reads metiladas KvDMR1	Expressão H19 (-2 <sup>ΔΔCq</sup> )	Expressão LIT1 (-2 <sup>ΔΔCq</sup> )
Paciente 1	S01	Septo retovaginal	46,90%	56,86%	0,06	1,77
	S02	Fossa Ovariana	38,61%	56,08%	0,01	1,03
Paciente 2	S03	Endometrioma	35,42%	60,79%	0,23	0,24
Paciente 3	S04	Fossa Ovariana	40,59%	55,85%	0,26	0,94
Paciente 4	S05	Septo retovaginal	34,92%	57,66%	0,07	1,16
Paciente 5	S06	Septo retovaginal	44,19%	59,69%	0,02	1,56
	S07	Bexiga	39,81%	61,24%	0,14*	1,46
Paciente 6	S08	Septo retovaginal	38,64%	51,06%	0,13	2,63
	S09	Bexiga	43,66%	50,57%	0,17	1,08
Paciente 7	S10	Septo retovaginal	45,85%	68,45%	0,03	0,93
	S11	Ovário	49,28%	59,07%	0,01	1,02
	S12	Fossa Ovariana	50%	61,31%	0,10	1,20
Paciente 8	S13	Ligamento uterossacro	47,28%	62,28%	0,02	1,68
	S14	Fossa Ovariana	42,51%	57,37%	0,06	2,05
Paciente 9	S15	Septo retovaginal	44,57%	52,95%	0,02	0,61
Paciente 10	S16	Septo retovaginal	38,21%	55,30%	0,37	2,00
	S17	Bexiga	33,84%	63,07%	0,13	0,73
	S18	Reto	33,94%	60,93%	0,06	2,50
Paciente 11	S19	Ligamento uterossacro	51,46%	52,89%	0,68	0,30
Paciente 12	S20	Septo retovaginal	49,65%	68,57%	0,03	2,16
Paciente 13	S21	Septo retovaginal	42,25%	62,65%	0,01	2,55
Paciente 14	S22	Septo retovaginal	44,52%	58,16%	0,04	1,33
	S23	Peritônio	47%	62,84%	0,03	1,71
Paciente 15	S24	Septo retovaginal	48,42%	55,38%	0,38	0,72

Legenda: \*Dado retirado das análises estatísticas devido ao desvio padrão ter sido superior a 0,5.

## ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, de forma voluntária, do projeto de pesquisa intitulado: “ASPECTOS GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS DA ENDOMETRIOSE PROFUNDA: IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MARCADORES DE PROGNÓSTICO”, sob responsabilidade dos professores Dr.<sup>a</sup> Cristiana Libardi Miranda Furtado e Dr. Leonardo Robson Pinheiro de Sobreira Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC) e da Maternidade-Escola Assis-Chateaubriand. O projeto tem como objetivo avaliar marcadores moleculares relacionados à endometriose nos seus graus mais diversos (leve, moderada e profunda). Marcadores moleculares podem ser porções do seu DNA, ou seja, o material genético que irá formar as proteínas e é responsável pelas suas características físicas. Alterações no DNA podem levar ao desenvolvimento de doenças como a endometriose, e os resultados obtidos nessa pesquisa poderão contribuir para um diagnóstico precoce e para um melhor planejamento terapêutico no tratamento da doença. Para isso precisaremos coletar uma amostra de sangue e tecidos dos focos de endometriose que serão retirados durante o procedimento cirúrgico para o tratamento da doença. Salientamos que os dados de prontuário coletados e sua identidade serão mantidos em sigilo e utilizados apenas nesta pesquisa, com os resultados dos grupos avaliados divulgados em eventos e/ou revistas científicas.

A coleta do tecido endometrial será realizada pelo médico ginecologista Dr. Leonardo Robson Pinheiro de Sobreira Bezerra através de uma videolaparoscopia, procedimento considerado minimamente invasivo, já previsto em pacientes que estão em fase de diagnóstico e/ou tratamento da endometriose. Além disso, serão coletados 5 mL de sangue periférico através de uma punção venosa. As amostras coletadas ficarão armazenadas em freezer com temperatura inferior a -30°C, e posteriormente serão submetidas a análises de molecular no Laboratório de Oncologia Experimental do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos sob responsabilidade dos pesquisadores principais para análise das modificações presentes no DNA e produtos dos genes alterados nos tecidos coletados nos diferentes locais de crescimento endometrial. O descarte de amostras remanescentes após as análises necessárias será feito por incineração, como já de rotina para o descarte para amostras biológicas.

Para sua participação e contribuição com a nossa pesquisa, necessitamos de uma autorização para que parte **excedente desse tecido endometrial** retirado na cirurgia seja encaminhado para o setor de pesquisa e posterior estudo. Salientamos que **não existem riscos físicos adicionais** decorrentes da participação das pacientes nesta pesquisa e que somente as amostras excedentes dos materiais retirados na cirurgia serão coletadas e estudadas pelos



pesquisadores, não sendo necessário nenhum procedimento médico adicional. Um possível risco inerente ao procedimento cirúrgico, é a possibilidade de existência de uma equimose (mancha arroxeada) ao redor do local onde foi realizada a cirurgia ou coleta venosa do sangue periférico, dor no local das incisões no abdome por onde passaram as pinças para a realização da cirurgia, sem a ocorrência de maiores consequências clínicas. Nos casos de alguma intercorrência pós-cirurgia, os participantes devem entrar em contato com os pesquisadores responsáveis imediatamente. Os benefícios estão relacionados com a identificação das alterações moleculares relacionadas ao desenvolvimento da endometriose, pois a caracterização da doença é essencial, não só para diagnosticar e classificar, mas para estabelecer os melhores protocolos de tratamento, possibilitando futuras melhoras para inúmeras mulheres portadoras de endometriose a partir dos resultados dessa pesquisa.

Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador, com a instituição ou com seu tratamento. Gostaríamos de deixar registrado que cada pesquisa clínica envolvendo seres humanos é submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), formado por um grupo de profissionais de diversas áreas, cuja função é avaliar as pesquisas e defender os interesses dos participantes e dos pesquisadores. Em caso de danos ou eventuais dúvidas sobre o procedimento ou sobre a pesquisa, os pesquisadores responsáveis por esse estudo estão à disposição para esclarecimentos. Ainda, caso haja alguma dúvida ética, você poderá a qualquer momento entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da MEAC no telefone (85) 3366-8569 ou (85) 3366-8523 no endereço Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 – Rodolfo Teófilo, Fortaleza – CE, 60430-270.

Após a leitura minuciosa deste termo e esclarecimento de eventuais dúvidas, caso deseje participar, você deve preencher e assinar o termo que se segue.

### CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_,  
portadora do RG \_\_\_\_\_, abaixo assinada, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar.

1. A garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
3. A segurança de que não serei identificada e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;



4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
  5. A disponibilidade de tratamento médico por parte da instituição de saúde, em caso de danos diretamente causados pela pesquisa;
  6. A garantia de receber uma cópia deste Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) devidamente assinada pelo pesquisador responsável;
- Tenho ciência do exposto acima e desejo participar do estudo.

Fortaleza, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

**Participante da pesquisa**



**Digitais caso não assine**

---

**Pesquisador responsável**

## ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

MATERNIDADE ESCOLA ASSIS  
CHATEAUBRIAND DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ - MEAC/UFC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Aspectos genéticos e epigenéticos da endometriose profunda: identificação de novos marcadores de prognóstico.

**Pesquisador:** LEONARDO BEZERRA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 85724824.8.0000.5050

**Instituição Proponente:** Maternidade Escola Assis Chateaubriand / MEAC/ UFC

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 7.417.515

#### Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos „Apresentação do Projeto, Objetivos da pesquisa e Avaliação de Riscos e benefícios“, foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB\_Informações Básicas do Projeto\_2380051.pdf

Aspectos Genéticos e Epigenéticos da Endometriose Profunda: identificação de novos marcadores de prognóstico, trata-se de um estudo observacional, transversal, braço único, prospectivo, em que serão avaliadas mulheres com endometriose profunda acometendo diversos tecidos, como reto, ovário, intestino (ectópica) e tecido endometrial (eutópica). O estudo será realizado no Setor de Endometriose da Clínica Ginecológica da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand (MEAC), que faz parte do complexo hospitalar da Universidade Federal do Ceará. As pacientes serão previamente informadas sobre a realização do estudo e serão incluídas pacientes que preencherem os critérios de inclusão preestabelecidos e consentirem em participar do estudo após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Serão avaliadas 60 pacientes com endometriose profunda, 60 pacientes com endometriose moderada e 60 amostras controle, em que as amostras serão obtidas através de cirurgia de videolaparoscopia, de acordo com os protocolos assistenciais do setor de Ginecologia e Obstetrícia da MaternidadeEscola Assis Chateaubriand (UFC), estando as pacientes anestesiadas. As análises de cultura de células das pacientes, CRISPR/Cas9, expressão gênica,