

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

LARISSA MILANI COUTINHO

**EXPRESSÃO DA 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESIDROGENASE TIPO
2 (17 β HSD2) NA ENDOMETRIOSE: NOVAS PERSPECTIVAS**

BELO HORIZONTE - MG

AGOSTO - 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

LARISSA MILANI COUTINHO

**EXPRESSÃO DA 17 β -HIDROXISTEROIDE DESIDROGENASE TIPO
2 (17 β HSD2) NA ENDOMETRIOSE: NOVAS PERSPECTIVAS**

**Tese de doutorado apresentada ao
Programa de pós-graduação em Medicina Molecular
para a obtenção do grau de Doutor(a) em
Medicina Molecular.**

Orientador: Prof. Fernando Marcos dos Reis

Co-orientador: Prof. Felice Petraglia

BELO HORIZONTE - MG

AGOSTO- 2021

Coutinho, Larissa Milani.
C871e Expressão da 17 β -Hidroxiesteroide Desidrogenases tipo 2 (17 β HSD2) na Endometriose [manuscrito]: novas perspectivas. Larissa Milani Coutinho. - - Belo Horizonte: 2021.
57f.: il.
Orientador (a): Fernando Marcos dos Reis.
Coorientador (a): Felice Petraglia.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. 17-Hidroxiesteroide Desidrogenases. 2. Endometriose. 3. Endométrio. 4. Estrogênios. 5. Dissertação Acadêmica. I. Reis, Fernando Marcos dos. II. Petraglia, Felice. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QU 140



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

FOLHA DE APROVAÇÃO

EXPRESSÃO DA 17 β -HIDROXIESTEROIDE DESIDROGENASE TIPO 2 (17 β HS2) NA ENDOMETRIOSE: NOVAS PERSPECTIVAS

LARISSA MILANI COUTINHO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia vinte e quatro de agosto de dois mil vinte e um, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores doutores:

Fernando Marcos dos Reis - Orientador
UFMG

Márcia Mendonça Carneiro
UFMG

Helen Lima Del Puerto
UFMG

Fernanda Polisseni Souza
UFF

Antônio Marcos Coldibelli Francisco
UNIVAS

Belo Horizonte, 24 de agosto de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Marcos dos Reis**, **Chefe de departamento**, em 26/08/2021, às 13:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helen Lima Del Puerto**, **Professora do Magistério Superior**, em 26/08/2021, às 13:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Polisseni Souza**, **Usuário Externo**, em 26/08/2021, às 15:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antônio Marcos Coldibelli Francisco**, **Usuário Externo**, em 30/08/2021, às 18:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Márcia Mendonça Carneiro**, **Professora do Magistério Superior**, em 16/09/2021, às 15:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_externo=0, informando o código verificador 0914339 e o código CRC 666AC19F.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu amado esposo Eduardo, por ter estado sempre ao meu lado em todos estes anos de formação, independentemente das circunstâncias. Obrigada pelo companheirismo, pelas nossas lindas filhas e por me incentivar a crescer mais a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Fernando Marcos dos Reis, que há 8 anos me acolheu no Laboratório de Reprodução Humana (LRH) -UFMG e foi responsável por ampliar a minha visão de mundo, da ciência e da Medicina. Minha eterna gratidão e admiração a você, professor, que me desafiou tantas vezes, me fazendo descobrir que eu era capaz de ir além das minhas próprias expectativas.

Ao meu co-orientador, prof. Felice Petraglia pela generosidade e acolhida em seu serviço no Careggi Ospedale na cidade de Florença (Itália), durante o doutorado sanduíche, que foi, sem dúvida nenhuma, o período de maior crescimento pessoal da minha vida.

Ao meu esposo Eduardo, sem o qual não conseguiria sequer ter iniciado este trabalho. Meu companheiro de vida e maior incentivador. Você não só possibilitou que este meu sonho se tornasse realidade, mas segurou a minha mão e sonhou junto comigo. E às minhas pequenas Lara e Alice que enchem meus dias de felicidade, me dão força e leveza para lutar as batalhas do dia a dia. Tudo isso é por vocês. Obrigada por serem meu porto-seguro.

Aos meus queridos pais, Marlene e Tadeu, pelo apoio incondicional e por serem meus maiores exemplos de força, caráter e dedicação. Vocês são responsáveis pela pessoa que me tornei hoje e serão sempre o meu norte. Obrigada também aos meus irmãos, Conrado e Diego, que sempre foram alicerce e exemplo.

Às queridas amigas Maíra Casalechi e Wiviane Alves que foram fundamentais na realização dos meus experimentos. Sem vocês este trabalho não teria sido possível. Minha eterna admiração e gratidão a vocês. E a todos os amigos do LRH-UFMG, obrigada por terem sido tão importantes na minha formação.

Aos amigos do Careggi Ospedale, Francesca Malentachi, Giulia Ciuffi, Chiara Donati, Caterina Bernacchioni, Valentina Vanuzzi, Tommaso Capezzuoli e Silvia Vannuccini pelo suporte e ajuda com os experimentos realizados em Florença (Itália).

Ao prof. Antônio Coldibelli Francisco pela parceria fundamental na seleção e inclusão de participantes da pesquisa.

Aos colegas do ICB-UFMG, Franciel, Walysson e prof^a Vanessa Pinho, pela ajuda nos experimentos de *Western Blotting*.

À Profa. Cristiana Buzelin Nunes, do Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina UFMG, pelo escaneamento das lâminas de imunohistoquímica.

Aos amigos da Universidade Federal de Juiz de Fora e toda equipe da Clínica Nidus Medicina Reprodutiva pelo apoio e suporte durante o período de Doutorado.

A todos os amigos e familiares que sempre torceram por mim.

A Deus, toda minha gratidão, por me conduzir nos momentos mais difíceis e me presentear com tantas bênçãos.

“Sto ancora imparando.”

(Michelangelo 1475-1564)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Parte dos experimentos foi realizada na Università degli Studi di Firenze-Florença/Itália, sob orientação do Prof. Felice Petraglia. Este estudo foi realizado com auxílio concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fondazione Careggi Onlus.

Resumo

Introdução: A endometriose é uma doença estrogênio-dependente. A teoria da deficiência de 17 β HSD2 no tecido ectópico poderia justificar o aumento dos níveis de estradiol no microambiente das lesões, devido à perda do efeito protetivo da enzima. Contraditoriamente, vários estudos evidenciaram a expressão do RNAm da 17 β HSD2 na endometriose.

Objetivos: Avaliar se uma influência epigenética resultante da expressão anormal de microRNAs (has-miR-26b-5p e has-miR-124-3p) nas lesões de endometriose poderia alterar a expressão gênica local do 17 β HSD2, de forma a impedir a transcrição do RNAm à proteína.

Materiais e métodos: Estudo transversal prospectivo. Foram obtidas 94 amostras, sendo 54 de lesões de endometriose (LE), 28 de endométrio eutópico (EE) das mesmas pacientes com endometriose e 12 de pacientes sem endometriose (EC). RT-PCR avaliou a expressão do has-miR-26b-5p e has-miR-124-3p em LE e EE. A expressão gênica do 17 β HSD2 foi avaliada em nível de RNAm por RT-PCR e em nível de proteínas por Western Blotting e imunohistoquímica nos 3 grupos.

Resultados: Não houve diferença na expressão de has-miR-26b-5p e has-miR-124-3p entre LE e EE. A presença de expressão do RNAm da 17 β HSD2 foi constatada nos 3 grupos, sem diferença estatística entre eles, tanto quando estudadas apenas as amostras sem exposição prévia a hormônios, bem como à análise de todas as pacientes (com ou sem uso de contraceptivo oral combinado - COC- ou progestagênio isolado no último mês). As lesões sob efeito progestínico tiveram expressão maior de RNAm da 17 β HSD2 ($p < 0.05$) em comparação com aquelas sob efeito de COC ou ausência de medicação hormonal. Confirmou-se, ainda, a presença da proteína 17 β HSD2 nas lesões.

Conclusões: Uma expressão anormal de has-miR-26b-5p e has-miR-124-3p nas lesões não pode justificar a teoria da deficiência da 17 β HSD2 na endometriose. Curiosamente, nossos achados não confirmaram a ausência da enzima nas lesões estudadas, mostrando que o comportamento de expressão da 17 β HSD2 na endometriose parece ser mais complexo do que se imaginava, e novas análises, inclusive do padrão de expressão mediante o uso de terapia clínica da doença, merecem ser mais bem exploradas.

Palavras-chave: 17-Hidroxiesteroide desidrogenases; endometriose; endométrio; estrogênio.

Abstract

Background: Endometriosis is an estrogen-dependent disease. A theory of deficient 17 β HSD2 expression in lesions, but not in paired eutopic endometrium, leading to high levels of local estradiol has been described as a potential molecular mechanism for the disease progression. Contradictorily, many studies available in the literature have found expression of 17 β HSD2 mRNA in ectopic tissue. **Objectives:** To evaluate whether the epigenetic influence of microRNAs (has-miR-26b-5p e has-miR-124-3p) could impair post-transcriptionally 17 β HSD2 protein synthesis in ectopic lesions. **Methodology:** This is a prospective cross-sectional study. We obtained a collection of 94 tissue samples: 54 endometriosis lesions (EL); 28 eutopic endometrium (EE); 12 endometrium from women without endometriosis (CE). RT-PCR was performed for evaluating has-miR-26b-5p and has-miR-124-3p expression in ectopic and eutopic endometrium. The 17 β HSD2 mRNA expression was evaluated by RT-PCR in the three groups. Western Blotting and immunohistochemistry were used to assess 17 β HSD2 expression and localization at protein level. **Results:** There was no difference in either has-miR-26b-5p or has-miR-124-3p expression between EL and EE. The presence of 17 β HSD2 mRNA was similar in the 3 groups, both including and excluding the samples obtained from women in use of hormonal therapy. Higher expression of 17 β HSD2 mRNA was detected in EL previously exposed to progestins-only, when compared to EL exposed to COC and EL with no prior exposure to hormone therapies ($p < 0.05$). **Conclusions:** An aberrant expression of has-miR-26b-5p and has-miR-124-3p in endometriotic lesions is probably not associated with disturbed 17 β HSD2 expression in endometriosis. Surprisingly, we could not confirm the deficient 17 β HSD2 expression in ectopic lesions. The role of 17 β HSD2 in endometriosis may be even more complex than assumed so far, and the regulation of its expression in different clinical scenarios should be further investigated.

Key words: 17beta-HSD type 2, human; endometriosis; endometrium; estrogen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fontes de estrogênio na endometriose	20
Figura 2: Ação oxidativa da 17β-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (17βHSD2)	21
Figura 3: Identificação dos miRNAs cujo gene alvo é o 17βHSD2 realizada através da busca na base de dados MiRTarBase	27
Figura 4: Hipótese do estudo: Expressão aumentada de miRNAs nas lesões de endometriose poderia impedir a tradução do RNAm do 17βHSD2 em proteínas?	28
Figura 5: Fluxograma das amostra utilizadas no estudo	32
Figura 6: Cortes de imunohistoquímica. A- Endométrio controle; B- Endométrio eutópico de paciente com endometriose; C- Lesão de endometriose de bexiga; D- Lesão de endometriose de intestino; E- Placenta: controle positivo; F- Placenta: controle negativo.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos que avaliaram a expressão da 17βHSD2 na endometriose. EE1: endométrio eutópico de pacientes com endometriose; EC2: endométrio controle, de pacientes sem endometriose. LE3: lesões de endometriose. NR†: não realizado.	24
Tabela 2: Características clínicas das pacientes com endometriose	31
Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores usados na RT-PCR em tempo real	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Expressão dos miRNAs no endométrio eutópico de pacientes com endometriose vs. lesões de endometriose peritoneal superficial (SUP). À esquerda do gráfico, não se evidenciou diferença na expressão do has-miR-26b-5p entre os grupos. À direita, também não houve diferença da expressão do has-miR-124-3p entre os dois grupos estudados. 38

Gráfico 2: Expressão de RNAm do 17 β HSD2 em amostras sem influência de tratamento hormonal. 39

Gráfico 3: Expressão de RNAm do 17 β HSD2 por RT-PCR (amostras com e sem tratamento hormonal). 40

Gráfico 4: Expressão de RNAm do 17 β HSD2 em amostras de pacientes em uso de progestagênio isolado. 40

Gráfico 5: Expressão de RNAm do 17 β HSD2 nas lesões, segundo exposição hormonal. Foi detectada expressão aumentada no grupo de amostras sob influência de progestagênio isolado com diferença estatisticamente significativa em relação aos outros dois grupos (COC e ausência de terapia hormonal). *p<0,05. 41

Gráfico 6: Expressão proteica do 17 β HSD2 nas amostras de lesões de endometriose, de endométrio eutópico e endométrio de pacientes sem endometriose. 42

Gráfico 7: Frequência de marcação da proteína 17 β HSD2 nos diferentes tipos de lesão, no endométrio eutópico e no endométrio controle. 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A4- androstenediona

COC- contraceptivo oral combinado

DHEA- dehidroepiandrosterona

DIP- doença inflamatória pélvica

DNA- ácido desoxirribonucleico

E1- Estrona

E1-S - Sulfato de estrona

E2 - 17 β -Estradiol

E3 - Estriol

EDTA - Ethylenediamine Tetraacetic Acid

GnRH- hormônio liberador de gonadotrofinas

IMC- índice de massa corporal

IMH- imunohistoquímica

miRNAs - microRNAs

P4 - Progesterona

PBS - Tampão salina-fosfato

RISC- RNA-induced silencing complex

RNA- ácido ribonucleico

RNA_m- ácido ribonucleico mensageiro

RT-PCR – Reação em cadeia de polimerase em tempo real

StAR- proteína reguladora aguda da esteroidogênese

S-DHEA- sulfato de dehidroepiandrosterona

TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF- vascular endotelial growth factor

3 β -HSD2- 3-beta hidroxisteroide desidrogenase tipo 2

17 β HSD - 17-beta hidroxisteroide desidrogenase

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO	16
1.1 – Endometriose: o que sabemos e o que falta desvendar	16
1.2 – Endometriose: uma doença estrogênio-dependente	17
1.3 – Metabolismo e biossíntese dos estrogênios na endometriose	18
1.4 – Família da 17 β -hidroxiesteroide desidrogenases (17 β HSD)	20
1.5 – A expressão da enzima 17 β HSD2 na endometriose	21
1.6 – Epigenética e o papel dos miRNAs	24
1.7 – Deficiência da enzima 17 β HSD2 na endometriose e microRNAs: haveria plausibilidade nesta relação?	26
II – OBJETIVOS	29
2.1 – Objetivo geral	29
2.2 – Objetivos específicos	29
III – MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 – Pacientes e amostras de lesões de endometriose e tecido endometrial eutópico	30
3.2 – A escolha das técnicas laboratoriais utilizadas no experimento	34
3.3 – Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR)	33
3.3.1 – Extração de RNA total e tratamento com DNase	33
3.3.2 – Síntese de cDNA por transcrição reversa	33
3.3.3 – Oligonucleotídeos específicos	34
3.3.4 – Reação de cadeia de polimerase em tempo real	34
3.4 – Western Blotting	35
3.5 – Imunohistoquímica	36
3.5.1 – Inclusão e corte	36
3.5.2 – Protocolo	36
3.6 – Análise estatística	37
IV – RESULTADOS	38
4.1 – Análise da expressão dos miRNAs has-miR-26b-5p e has-miR-124-3p por RT-PCR	38
4.2 – Análise da expressão do RNAm 17 β HSD2 por RT-PCR	39
4.3 – Avaliação da expressão da proteína 17 β HSD2 por Western Blotting	41
4.4 – Avaliação da expressão da proteína 17 β HSD2 por imunohistoquímica	42
V – DISCUSSÃO	45

VI – CONCLUSÕES	50
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

I- INTRODUÇÃO

1.1- Endometriose: o que sabemos e o que falta desvendar

A endometriose é uma doença ginecológica caracterizada pela presença de tecido semelhante ao endometrial, composto por glândula e/ou estroma, fora da cavidade uterina (Zondervan et al. 2018). É considerada uma condição inflamatória crônica, estrogênio-dependente, prevalente em mulheres na menacme. Ainda que primariamente benigna, trata-se de patologia ligada à alta morbidade e comprometimento da qualidade de vida, podendo cursar com quadros algícos importantes e subfertilidade (Giudice and Kao 2004a).

Estima-se que a doença acometa cerca de 10% das mulheres em idade reprodutiva em todo o mundo (Viganò et al. 2004). No entanto, a endometriose é provavelmente uma condição subdiagnosticada. Principalmente quando presente em adolescentes, os quadros de dismenorreia e dor pélvica ligados à doença são muitas vezes confundidos com eventos fisiológicos do ciclo menstrual relacionados aos primeiros anos da menacme. A inespecificidade dos sintomas e a necessidade de cirurgia para confirmação histopatológica dificultam o manejo precoce da doença. Estima-se que o tempo compreendido entre o início dos sintomas e a definição diagnóstica varie, em média, de 7 a 11 anos (Hadfield et al. 1996).

A endometriose possui formas clínicas diversas. As pacientes podem cursar com um ou mais dos seguintes tipos de apresentação da doença: lesão cística ovariana (endometrioma); lesão peritoneal superficial; lesão profunda infiltrativa. Esta última é conceitualmente definida como o implante ectópico que se aprofunda mais do que 0,5 cm no peritônio. Apesar do acometimento de órgãos e estruturas pélvicas ser o mais comum, os implantes também podem ocorrer em sítios extrapélvicos, a citar: diafragma, pleura, pulmão, pericárdio e cérebro (Bulun et al. 2019).

Quanto à classificação, mais de um sistema já foi proposto, mas o mais frequentemente utilizado é a versão revisada da *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) de 1997, segundo o qual a endometriose pode ser dividida em quatro estágios: mínima (I), leve (II), moderada (III) e severa (IV). Tal classificação, no entanto, não tem correspondência com a sintomatologia algíca ou ocorrência de infertilidade (“Revised American Society for Reproductive Medicine Classification of Endometriosis: 1996” 1997).

O porquê a doença surge e os fatores relacionados à sua progressão são questões que ainda carecem de maiores esclarecimentos. Entretanto, nas últimas décadas, vem crescendo o número de estudos que buscam o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na

sua fisiopatologia, bem como a descoberta de novas formas de diagnóstico e tratamento (Taylor, Kotlyar, and Flores 2021). Por tratar-se de uma condição que possui múltiplas apresentações e quadro clínico variável, é possível que as diferentes formas de lesão possam ser entidades distintas, com mecanismos patogênicos próprios (Donnez et al. 1996; Nisolle and Donnez 1997).

Segundo a mais clássica teoria fisiopatológica da doença, células endometriais chegariam à pelve através do refluxo do sangue menstrual pelas tubas uterinas (Sampson 1927). Todavia, este mecanismo, isoladamente, não seria capaz de explicar os casos extrapélvicos. Além disso, o refluxo da menstruação constitui evento comum, estando presente em grande parte das mulheres saudáveis. Decerto, o mais provável é que a endometriose deva ser uma doença multifatorial. Metaplasia celômica, células tronco, autoimunidade e influência genética e epigenética são algumas das diversas teorias fisiopatológicas que surgiram ao longo das últimas décadas como potenciais participantes no processo de desenvolvimento dos implantes ectópicos (Shigesu et al. 2019; Matsuura et al. 1999; Sasson and Taylor 2008; Saha et al. 2015; Taylor, Kotlyar, and Flores 2021).

Estudos epidemiológicos mostram um risco duas vezes maior de endometriose em mulheres cujas mães apresentam a patologia, assim como uma concordância na ocorrência das lesões ectópicas em irmãs gêmeas monozigóticas (Dalsgaard et al. 2013; Saha et al. 2015). Apesar disso, estudos de associação genômica ampla (*Genome Wide Association Studies- GWAS*) não comprovaram um padrão específico de herdabilidade ou a existência de um gene único relacionado à doença. Evidências crescentes corroboram o possível envolvimento de múltiplos genes e uma complexa combinação entre mecanismos genéticos e epigenéticos. Estes últimos parecem estar envolvidos em diversas alterações imunológicas, imunohistoquímicas e histológicas no endométrio eutópico e ectópico das pacientes com endometriose (Laganà et al. 2019a; Guo 2009).

1.2- Endometriose: uma doença estrogênio-dependente

A despeito das incertezas envolvendo a fisiopatologia da endometriose, a influência do estrogênio como fator-chave na manutenção e progressão das células endometriais ectópicas é questão indiscutível. Tal relação é percebida clinicamente pela alta prevalência da patologia em mulheres em idade reprodutiva e a tendência à regressão após a menopausa. Raros casos de endometriose relatados em homens foram associados ao uso de terapia estrogênica prolongada para tratamento do câncer de próstata (Martin and Hauck 1985; Rei, Williams,

and Feloney 2018). Além disso, a ação pretendida através das principais opções terapêuticas por ora disponíveis visa justamente a supressão ovariana e consequente redução dos níveis circulantes de estradiol, levando à estabilização da doença (Huhtinen et al. 2012).

Inúmeros estudos experimentais também corroboram o importante papel do estrogênio como cerne do processo inflamatório que caracteriza a endometriose. A ação do estradiol nos implantes ectópicos, independentemente da origem das células *endometrial-like*, promoveria um ambiente adequado para a sua manutenção e progressão fora da cavidade endometrial. Dentre os possíveis mecanismos moleculares através dos quais os estrogênios atuam na endometriose, podemos citar: ativação de macrófagos e consequente secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e indução da expressão de fatores angiogênicos (VEGF); ativação de genes antiapoptóticos, como o Bcl-2, e das proteínas quinases ERK1/2 e Akt (Reis et al. 2013; Laganà et al. 2019a; Bulun et al. 2019; Patel et al. 2017; Y et al. 2018; McLaren et al. 1997).

A ação estrogênica nos implantes ectópicos é um processo bastante complexo e ainda não totalmente elucidado (Rižner 2009). A síntese de estrogênios no interior das lesões, a partir da presença local de um maquinário enzimático capaz de transformar formas inativas de esteroides circulantes em estradiol e até a produção *de novo* pelo colesterol, parece exercer um papel importante na fisiopatologia da doença (T. Šmuc and Rižner 2009; Gibson et al. 2018).

1.3- Metabolismo e biossíntese dos estrogênios na endometriose

Dá-se o nome de estrogênios ao grupo genérico de compostos químicos cujos principais representantes são: estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3). A partir da transformação do colesterol, molécula de 27 átomos de carbono, uma sucessão de reações em cadeia ocorre, através das quais são formados outros esteroides sexuais como progestogênios (esteroides C-21) e androgênios (esteroides C-19), até chegar à formação dos estrogênios (esteroides C-18). O estradiol é a principal forma atuante durante os anos reprodutivos da mulher, sendo o mais biologicamente ativo. A estrona consiste na forma menos ativa e predomina no período pós-menopausal. O E3, por sua vez, é produzido pela placenta, sendo característico do período gestacional (Merchenthaler 2018).

Embora na menacme a fonte mais popularmente conhecida de estradiol sejam os ovários, a presença do hormônio no endométrio resulta de mais de uma via, incluindo os mecanismos endócrino, parácrino, autócrino e intrácrino (Nelson and Bulun 2001). A

capacidade dos tecidos alvos periféricos produzirem hormônios esteroides a partir de precursores sanguíneos foi descrita pela primeira vez em 1991, por Labrie. O autor quebrou paradigmas ao sugerir que cerca de 75% dos estrogênios presentes em mulheres na menacme, e quase 100% em mulheres na pós-menopausa, seriam advindos da produção nos tecidos periféricos a partir de precursores esteroides adrenais (Labrie 1991).

Com o passar dos anos, o conhecimento acerca do maquinário enzimático presente em tecidos periféricos (ex.: endométrio, trato gastrointestinal, pulmões, SNC e ossos) vem sendo construído. Os mecanismos envolvidos são altamente complexos e muito provavelmente contam com a participação das mesmas enzimas presentes em ovários e adrenais, além de outras vias metabólicas alternativas e adicionais (Konings et al. 2018).

Nos ovários, o processo de formação do E2 depende da proteína reguladora aguda da esteroidogênese, StAR, que permite a passagem do colesterol do citoplasma para a mitocôndria. As enzimas CYP11A1 e CYP17A1 participam da formação de dehidroepiandrosterona (DHEA) nas células da teca que, por sua vez, é convertida em androstenediona (A4) pela 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (3 β HSD2). O citocromo p450 19A1 (CYP19A1, aromatase) catalisa a conversão de A4 em E1. A 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 (17 β HSD1) transforma E1 em E2. A A4 também pode ser primeiramente reduzida a testosterona e depois aromatizada a E2. Por mecanismo endócrino, o E2 cai na corrente sanguínea e chega ao endométrio, onde se liga aos receptores de estrogênio aí presentes. Mas, além dele, os ovários também liberam na circulação: E1, sulfato de estrona (E1-S) e os precursores androgênicos, como A4 e DHEA (Huhtinen et al. 2012; Konings et al. 2018).

A esteroidogênese adrenal também libera por mecanismo endócrino a A4, DHEA e o sulfato de dehidroepiandrosterona (S-DHEA). Além disso, tecidos periféricos como fígado, pâncreas, ossos, pele, tecido adiposo são fontes extragonadais de sulfato de estrona (Huhtinen et al. 2012; Konings et al. 2018).

Assim, podemos considerar, de forma simplificada, que o estradiol atuante no endométrio possa ser advindo das seguintes vias: 1) E2 proveniente dos ovários; 2) Precursores androgênicos e formas sulfatadas de estrogênio liberados na corrente sanguínea por ovários, adrenais e tecidos periféricos (Huhtinen et al. 2012; Konings et al. 2018; Rižner 2009).

A expressão aberrante de receptores e enzimas envolvidos no metabolismo estrogênico local parece exercer um papel chave na fisiopatologia de doenças estrogênio-

dependentes, como os cânceres de mama e de endométrio, e a endometriose (Gibson et al. 2018).

Apesar dos resultados controversos e metodologia variável dos estudos sobre o tema, é possível que na endometriose, além das vias já citadas, ainda possa haver a síntese de estrogênios *de novo* a partir do colesterol (Attar et al. 2009). Expressão aumentada da StAR, *upregulation* ou *downregulation* de enzimas pertencentes às vias da Aromatase e Sulfatase, incluindo as proteínas da família das 17 β -hidroxiesteroide desidrogenases (17 β HSD), são algumas das possíveis alterações existentes em lesões de endometriose evidenciadas por estudos *in vitro*, ao longo dos últimos anos (Huhtinen et al. 2012) (**Figura 1**).

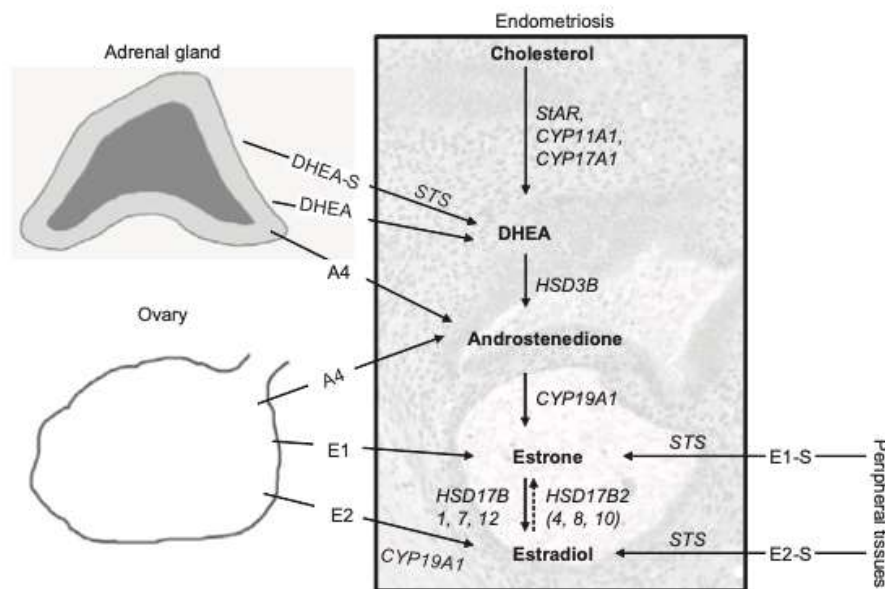


Figura 1: Fontes de estrogênio na endometriose. Fonte:Huhtinen et al. 2012.

1.4- Família das 17 β -hidroxiesteroide desidrogenases (17 β HSD)

A família das 17 β -hidroxiesteroide desidrogenases constitui um grupo de isoenzimas responsáveis pela interconversão de formas ativas e inativas de androgênios e estrogênios. É composta por representantes redutoras e oxidativas. As primeiras (ex.: 17 β HSD tipos 1, 7 e 12) são capazes de catalisar as formas inativas dos hormônios aos seus estados mais ativos (ex.: E1 em E2; androstenediona em testosterona). As últimas (ex.: 17 β HSD tipos 2, 4, 8 e 10) realizam a reação inversa, sendo responsáveis pela inativação dos esteroides sexuais (Rižner 2009; Huhtinen et al. 2012).

A E1 é considerada uma forma fraca de estrogênio, pois possui um potencial muito menor que o E2 de ativar os receptores estrogênicos (TSENG and GURPIDE 1973). Desta forma, as 17 β HSD têm o poder de controlar a ocupação do receptor de estrogênio, exercendo papel fundamental na regulação do metabolismo esteroide nos tecidos alvos (Jansson 2009; Rižner 2009).

As enzimas desta família encontram-se presentes em vários tecidos e participam ativamente da biossíntese dos hormônios esteroides. A 17 β -HSD tipo 1 é a principal representante redutora. É altamente expressa nas células granulosas dos folículos ovarianos de mulheres saudáveis. A 17 β -HSD2, é a mais importante das isoenzimas oxidativas, e será mais bem descrita na **Seção 1.5**.

A expressão gênica aberrante dessas enzimas na endometriose, capaz de aumentar a atividade estrogênica nas lesões, vem sendo estudada. Os resultados, todavia, não são claros e ainda há muito o que se descobrir (Giudice and Kao 2004b; Huhtinen et al. 2012; Ferrero et al. 2004).

1.5- A expressão da enzima 17 β HSD2 na endometriose

O gene 17 β HSD humano tipo 2 está localizado no cromossomo 16, 16q24. O produto final de sua expressão é a proteína transmembrana 17 β HSD2, responsável pela oxidação, isto é, conversão das formas ativas de 17 β -hidroxiesteroides (estradiol, testosterona e dihidrotestosterona) em suas formas menos ativas. Alguns estudos *in vitro* mostraram que a 17 β HSD2 participa, ainda, da oxidação da 20-alfa-dihidroprogesterona a progesterona. O papel primordial desta enzima parece ser primariamente protetivo, uma vez que é capaz de prevenir a ação excessiva dos hormônios esteroides nos tecidos alvos (Casey, MacDonald, and Andersson 1994a; Lu, Huang, and Lin 2002; Gibson et al. 2018).



Figura 2: Ação oxidativa da 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (17 β HSD2).

Em seres humanos, os locais nos quais a 17 β HSD2 é altamente expressa são: endométrio, placenta, fígado e intestino delgado. Menores quantidades da enzima também estão presentes em rins, pâncreas, cólon e próstata. A expressão de RNAm da 17 β HSD2 também já foi descrita em linhagens celulares de cânceres de mama, de endométrio e de próstata (Lu, Huang, and Lin 2002). Contudo, não parece estar presente nos ovários, cérebro, músculo esquelético, coração, baço e timo (“Tissue Expression of HSD17B2 - Summary - The Human Protein Atlas” n.d.).

No endométrio de mulheres saudáveis, a 17 β HSD2 é expressa principalmente nas células epiteliais glandulares, e parece exercer um papel na diferenciação endometrial na segunda fase do ciclo menstrual. Acredita-se que a sua expressão possa sofrer a regulação da progesterona, hormônio produzido pelo corpo lúteo formado após a ovulação e, portanto, presente em altos níveis apenas na segunda fase do ciclo (Casey, MacDonald, and Andersson 1994a; TSENG and GURPIDE 1973; Mustonen et al. 1998).

Há pouco mais de duas décadas, Zeitoun *et al.* observaram uma deficiência da enzima 17 β HSD2 em lesões endometrióticas extraovarianas. Segundo os autores, uma ação aberrante da progesterona na endometriose poderia induzir à inativação da 17 β HSD2 (Zeitoun et al. 1998). Desde então, esta hipótese vem sendo considerada como um dos possíveis mecanismos envolvidos na gênese da doença. Na ausência da enzima 17 β HSD2, o tecido ectópico perderia o fator protetivo de inativação do estrogênio e ficaria mais exposto às formas ativas do hormônio, o que poderia contribuir para o crescimento das lesões.

Apesar dos achados de Zeitoun *et al.* ainda serem os mais citados na literatura quando o assunto é o papel da 17 β HSD2 na endometriose (Bulun et al. 2000; Bulun et al. 2002; Qi, Guo, and Liu 2017; Laganà et al. 2019b; Bulun et al. 2019), este foi um estudo preliminar, com poucos casos, metodologia limitada e obtenção de resultados divergentes conforme a técnica escolhida para análise (Zeitoun et al. 1998).

Embora, os autores não tenham mostrado os dados na íntegra, o artigo cita que inicialmente foi realizada RT-PCR que detectou a expressão do RNAm do 17 β HSD2 em todas as 8 amostras de tecido endometrial eutópico analisadas e ainda em 7 dos 8 tecidos endometrióticos. Portanto, pode-se considerar que a expressão do RNAm da referida enzima foi evidenciada tanto nas lesões como no endométrio eutópico, em ambas as fases proliferativa e secretora. Uma diferença na expressão do RNAm entre os dois grupos foi detectada apenas em um segundo momento, utilizando-se uma técnica de detecção menos sensível, o *Northern Blotting* (Zeitoun et al. 1998).

Através do *Northern Blotting*, a expressão do RNAm do 17 β HSD2 foi detectada apenas na fase secretora de endométrio eutópico (n=12), sendo que 8 amostras de tecido endometriótico das mesmas pacientes tiveram nenhuma detecção do RNAm. Foram avaliados 4 amostras de tecido eutópico em fase proliferativa, nos quais não foi detectada expressão. Nenhuma das amostras de tecido ectópico, tanto na fase proliferativa quanto na secretora, foi positiva para RNAm através da referida técnica. Por fim, a imunohistoquímica (IMH) não identificou a presença da proteína 17 β HSD2 nas lâminas de lesões de endometriose (Zeitoun et al. 1998).

Outros estudos foram realizados a partir daí, e dados conflitantes foram evidenciados. Matsuzaki *et al.* e Dassen *et al.* observaram um *downregulation* da expressão gênica de RNAm da 17 β HSD2 em lesões de endometriose profunda (Matsuzaki, Canis, Pouly, Déchelotte, et al. 2006; Dassen et al. 2007). Mas o último grupo usou um tipo diferente de anticorpo na IMH e não pôde confirmar se a proteína seria expressa em menores níveis na endometriose (Dassen et al. 2007). Carneiro *et al.* em 2007, encontraram um padrão completamente diferente de Zeitoun *et al.* com maiores níveis de expressão de RNAm da 17 β HSD2 nos implantes endometrióticos quando comparados ao grupo controle. Também encontraram expressão da proteína, por imunohistoquímica, no epitélio glandular de implantes pélvicos de endometriose (Carneiro et al. 2007).

A maior parte dos estudos realizados até hoje dispôs de um número reduzido de amostras, não contemplando todos os tipos de apresentação clínica da doença. Apesar do conceito de deficiência da enzima 17 β HSD2 na endometriose continuar prevalecendo, não se pode negar que a expressão do mRNA foi detectada em vários estudos, inclusive no de Zeitoun *et al.* É possível que o processo de expressão gênica da 17 β HSD2 nas lesões ectópicas seja mais complexo do que se imaginava há duas décadas, e que fatores epigenéticos envolvidos possam ajudar a explicar as alterações encontradas até o momento.

A **Tabela 1** traz um compilado dos estudos que avaliaram a expressão da 17 β HSD2 na endometriose.

Tabela 1: Estudos que avaliaram a expressão da 17 β HSD2 na endometriose.

ESTUDO	TIPO DE LESÃO ENDOMETRIOSE	CONTROLE(S)	EXPRESSÃO RNAm 17 β HSD2	EXPRESSÃO PROTEÍNA 17 β HSD2
Zeitoun, 1998 (Zeitoun et al. 1998)	Extraovariana	EE ¹ EC ²	-RT-PCR: EE (8/8) LE ³ (7/8) -Northern blotting: EE secretor (12/12). Ausente nos EE proliferativos. EE = EC. Ausente nas LE (qualquer fase). *8 LE não expressaram RNAm enquanto seus EE pareados sim.	-Imunohistoquímica: EE secretor (11 / 13) EE proliferativo (1 /8) Ausente nas LE (qualquer fase do ciclo) *Detectou -se a proteína apenas no EE e não nas LE de 4 amostras pareadas.
Matsuazaki, 2006 (Matsuazaki, Canis, Pouly, Déchelotte, et al. 2006)	Profunda	EE EC	-RT-PCR: LE (8 / 16) EE (28 /30) EC (22 de 24)	NR [†]
Matsuazaki, 2006b (Matsuazaki, Canis, Pouly, Botchorishvili, et al. 2006)	Ovariana	EE	- RT-PCR: LE (12/ 12) detectou-se aumento significativo, p<0,03, de expressão das LE em relação ao EE, na fase proliferativa.	NR
Dassen, 2007 (Dassen et al. 2007)	Profunda	EE EC	- RT-PCR: Redução significativa de expressão nas LE do que EE e EC. EE = EC	-Imunohistoquímica: LE = EE = EC (redução da marcação somente no estroma das lesões)
Smuc, 2007 (Tina Šmuc et al. 2007)	Ovariana	EC	-RT-PCR: Não encontrou diferença significativa entre LE (n=16) e EC (n=9)	NR
Carneiro, 2007 (Carneiro et al. 2007)	Ovariana Superficial	EE EC	- RT-PCR: LE (8 /8) EE (5 /6) EC (7 /13) *Houve diferença significativa entre a expressão das LE e EC.	-Imunohistoquímica: LE e EE Quase indetectável nos EC

EE¹: endométrio eutópico de pacientes com endometriose; EC²: endométrio controle, de pacientes sem endometriose. LE³: lesões de endometriose. NR[†]: não realizado.

1.6- Epigenética e o papel dos microRNAs

No final do século XIX e início do século XX, dominava no meio científico a ideia de que o material genético estivesse intrinsecamente relacionado a estruturas citoplasmáticas. A

partir da observação de Francis Crick, em 1958, de que o ácido desoxirribonucleico (DNA) presente nos cromossomos e, portanto, no núcleo celular, seria a estrutura detentora do material genético, nasce um conceito denominado “dogma central da biologia molecular”. Segundo o mesmo, a inter-relação do DNA, RNA e proteínas seguiria um padrão linear e unidirecional (DNA produz RNA, que por sua vez, produz proteínas) (Crick 1958).

Com o passar dos anos, contudo, a participação de outras moléculas no processo de produção de proteínas começou a ser mais amplamente explorada (Lu, Huang, and Lin 2002). O reconhecimento de eventos epigenéticos responsáveis pela regulação genômica trouxe uma nova forma de entender os processos biológicos dos organismos eucarióticos (Berger et al. 2009). Por meio de mecanismos como as modificações pós-translacionais da histona, a metilação do DNA e a atuação dos *non-coding* RNAs, a epigenética é responsável por interferir na expressão gênica de maneira estável e potencialmente hereditária, sem alterar a sequência de DNA (Qi, Guo, and Liu 2017).

Os *non-coding* RNAs são moléculas de RNA incapazes de codificar proteínas, porém com alto poder de regularização do processo de expressão dos genes. Dentre estes, destacam-se os microRNAs (miRNAs), uma classe de pequenas moléculas de RNA endógeno, de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento (Marí-Alexandre et al. 2016). Foram descritos pela primeira vez em 1993, por Victor Ambros, Rosalind Lee e Rhonda Feinbaum. Durante o estudo do desenvolvimento da larva de *Caenorhabditis elegans*, os autores conseguiram identificar a diminuta estrutura de RNA capaz de reprimir uma linhagem gênica (lin-14 gene) (Lee, Feinbau and Ambros 1993).

Os miRNAs agem basicamente silenciando a expressão de genes alvos, através de sua incorporação a um sistema denominado “RNA-induced silencing complex” (RISC). Através deste complexo, os miRNAs promovem um *downregulation* pós-transcricional, que pode ocorrer de dois modos distintos: clivagem do RNAm ou repressão da tradução. O primeiro mecanismo refere-se à capacidade do miRNA de cortar a fita de RNAm, levando à sua inutilização e posterior destruição pela célula. O segundo, ocorre quando a presença do RISC contendo miRNA atrapalha o processo de tradução, impedindo a produção de proteínas (Marí-Alexandre et al. 2016; Bartel 2004).

Os miRNAs parecem estar envolvidos em uma série de processos biológicos como a diferenciação celular e a apoptose, e processos patológicos, assim como o câncer e a endometriose. A descoberta de padrões de expressão aberrantes de miRNAs em determinadas doenças pode ajudar na compreensão de mecanismos patológicos ainda pouco elucidados e no

desenvolvimento futuro de novas opções terapêuticas capazes de interferir no código epigenético (Chou et al. 2018; Borghese et al. 2017).

1.7- Deficiência da enzima 17 β HSD2 na endometriose e microRNAs: haveria plausibilidade nesta relação?

Após cuidadosa revisão da literatura, pode-se constatar que, passados mais de 20 anos desde a publicação do estudo de Zeitoun *et al* (1998), a teoria da deficiência da 17 β HSD2 na endometriose proposta pelos autores continua sendo a mais citada nos artigos de revisão acerca do tema (Bulun et al. 2000; Bulun et al. 2002; Qi, Guo, and Liu 2017; Laganà et al. 2019b; Bulun et al. 2019).

Apesar do conceito de deficiência da expressão proteica do 17 β HSD2 na endometriose continuar prevalecendo, não se pode negar que a expressão gênica do RNAm da enzima foi detectada em vários estudos, inclusive no de Zeitoun *et al.*, quando utilizada a técnica de PCR. A realização de novos trabalhos que analisem um número maior e mais variado de amostras se faz necessária, uma vez que é possível que formas clínicas diversas da doença possam apresentar expressões diferentes da enzima. Além disso, é possível que o processo de expressão gênica da 17 β HSD2 na endometriose seja muito mais complexo do que se imaginava há duas décadas, e que fatores epigenéticos envolvidos possam ajudar a explicar as alterações encontradas até o momento.

Como vimos acima, a combinação de fatores genéticos e epigenéticos possivelmente faz parte do complexo processo fisiopatológico da endometriose (Taylor, Kotlyar, and Flores 2021). Estudos baseados em técnicas de sequenciamento de nova geração e *microarrays*, com validação por RT-PCR, têm comprovado a existência de assinaturas específicas de miRNAs na endometriose. À análise por bioinformática, muitos destes miRNAs parecem estar associados à regulação da expressão de genes ligados à proliferação e sobrevivência celular, remodelamento da matriz e angiogênese. Todos estes sistemas mantêm íntima relação com a fisiopatologia da endometriose, o que reforça a participação destas pequenas moléculas no mecanismo da doença (Burney et al. 2009; Ohlsson Teague et al. 2009; Hawkins et al. 2011; Marí-Alexandre et al. 2015; Gilabert-Estelles et al. 2012).

A expressão aumentada na endometriose de alguns genes ligados à esteroidogênese (ex.: STAR, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1 e HSD17B1) parece estar relacionada a possíveis alterações na metilação de seus promotores (Qi, Guo, and Liu 2017; Bulun et al. 2019). Assim sendo, é bastante provável que outros fatores epigenéticos também participem

do mecanismo de sinalização esteroide no interior das lesões, predispondo a síntese e a ação do estradiol neste microambiente.

Diante destes dados, levantamos a seguinte provocação: Poderia a expressão gênica da enzima 17 β HSD2 sofrer interferência de microRNAs específicos capazes de regular negativamente o RNAm, impedindo a produção da referida proteína nas lesões?

Através de pesquisa realizada pelo MiRTarBase, base de dados online específica para a busca de interações experimentalmente validadas entre miRNAs e seus genes alvos, identificamos dois miRNAs cujo gene de interesse é o 17 β HSD2. São eles: has-miR-124-3p e has-miR-26b-5p (**Figura 3**).

ID	Species (miRNA)	Species (Target)	miRNA	Target	Validation methods							Sum	# of papers	
					Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	PSiAC	Other			
MI0122540	Homo sapiens	Homo sapiens	has-miR-124-3p	HSD17B2				✓					1	1
MI0126188	Homo sapiens	Homo sapiens	has-miR-26b-5p	HSD17B2				✓					1	1

Figura 3: Identificação dos miRNAs cujo gene alvo é o 17 β HSD2 realizada através da busca na base de dados MiRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>). Acesso realizado em 25/02/2019.

Nós, portanto, levantamos a hipótese de que a expressão aumentada dos miRNAs has-miR-26b-5p e has-miR-124-3p nas lesões de endometriose, mas não no endométrio eutópico (já que segundo Zeitoun, a ausência da enzima ocorre apenas no tecido ectópico), possa regular negativamente a expressão do gene 17 β HSD2 a nível pós-transcricional, impedindo a tradução da proteína. Como consequência, haveria acúmulo de altos níveis de estradiol nos implantes endometrióticos.

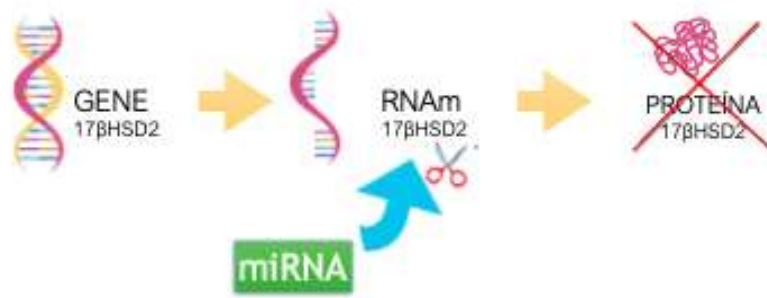


Figura 4: Hipótese do estudo: Expressão aumentada de miRNAs nas lesões de endometriose poderia impedir a tradução do RNAm do 17βHSD2 em proteínas.

II- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Investigar se um efeito epigenético decorrente da expressão aumentada dos miRNAs has-miR-26b-5p e has-miR-124-3p em lesões de endometriose, mas não em tecido eutópico, poderia modular negativamente a expressão da proteína 17 β HSD2 no tecido ectópico.

2.2- Objetivos específicos

- 1) Avaliar a expressão dos miRNA has-miR-26b-5p e has-miR-124-3p pela técnica de RT-PCR em lesões ectópicas e endométrio eutópico de pacientes com endometriose.
- 2) Avaliar a expressão do RNAm da 17 β HSD2 em lesões de endometriose, endométrio eutópico pareado de pacientes com endometriose, e endométrio de pacientes sem endometriose, pela técnica de RT-PCR.
- 3) Avaliar a expressão da proteína 17 β HSD2 nas lesões de endometriose e no endométrio eutópico pareado de pacientes com endometriose, endométrio de pacientes sem endometriose, pelas técnicas de *Western Blotting* e imunohistoquímica.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi fruto de uma parceria entre o Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, situado em Belo Horizonte, MG, o Hospital das Clínicas Samuel Libânio da Fundação de Ensino Superior do Vale do Sapucaí, em Pouso Alegre, MG, e o *Careggi Ospedale* pertencente à *Università degli Studi di Firenze*, em Florença/FI, Itália. Foi obtida a aprovação do Comitê de Ética (CAAE: 60378816.1.0000.5149) e todos os sujeitos da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.1- Pacientes e amostras de lesões de endometriose e tecido endometrial eutópico

O presente trabalho contou com um total de 94 amostras para análise. O grupo de estudo foi formado por 28 pacientes na menacme, submetidas a videolaparoscopia para tratamento da endometriose, com confirmação histopatológica da doença. Neste grupo, foram obtidos 54 espécimes de lesões de endometriose e 28 de endométrio eutópico pareado, que foi utilizado como controle. As amostras de endométrio intrauterino foram obtidas imediatamente antes do ato operatório, estando a paciente sob anestesia, através da aspiração intrauterina por Pipelle®. Foram extraídas lesões de diversos sítios, a citar: intestino delgado, retossigmoide, vagina, bexiga, parede, ligamento útero-sacro, região retrocervical, peritônio, ovário. Estes dois grupos foram respectivamente denominados: “lesões de endometriose” (LE) e “endométrio eutópico” (EE).

Um segundo grupo controle, denominado “endométrio controle” (EC), foi formado por outras 12 pacientes na menacme, sem suspeita ou diagnóstico de endometriose, que fossem se submeter à inserção de DIU (dispositivo intrauterino) ou que tivessem indicação de videolaparoscopia ou videohisteroscopia. As indicações cirúrgicas foram: leiomiomatose uterina, pólipos, cisto ovariano mucinoso e aderências pélvicas (sem sinais agudos de DIP ou focos de endometriose). A aspiração de endométrio foi realizada por Pipelle®. Todas as amostras de tecido obtidas foram imersas em solução inibidora de RNase (*RNAlater*, Sigma-Aldrich) e depois congeladas e conservadas a -80°C. Um fragmento de cada amostra também foi fixado em *Histochoice*® (Sigma-Aldrich) para posterior inclusão em parafina.

Os grupos de pacientes com e sem endometriose não diferiram quanto à idade no momento da cirurgia (36.0 ± 8.6 anos e 37.2 ± 5.8 anos, respectivamente) e IMC (24.8 ± 3.1

kg/m² e 26.1 ± 3.7 kg/m², respectivamente). A **Tabela 2** traz as características clínicas das pacientes com endometriose.

Tabela 2: Características clínicas das pacientes com endometriose.

	Média (95% IC)	Frequência (%)
Dismenorreia (VAS)	7.18 (95% IC: 5.96 -8.4)	-
Dispareunia (VAS)	3.29 (95% IC:1.77 – 4.8)	-
Dor pélvica acíclica (VAS)	2.00 (95% IC: 0.74 – 3.26)	-
ASRM <i>score</i>	40.21 (95% IC: 29.54 – 50.89)	-
ASRM <i>stage</i> (III/IV)	-	78.6%
Infertilidade	-	67.9%
Adeniose associada	-	25%

* VAS: *visual analogue scale* (escala visual analógica da dor).

Quanto ao uso de medicação hormonal no último mês, entre as pacientes com endometriose, 50% tinham usado progestágeno isolado, 32% contraceptivo oral combinado (COC) e 17% nenhuma terapia hormonal. Entre as pacientes sem endometriose, 33% estavam em uso de progestágeno isolado, 8% COC e 58% sem medicação hormonal. Nenhuma paciente incluída no estudo havia utilizado análogo do GnRH. Na **Figura 5** encontram-se descritas as 94 amostras trabalhadas no presente estudo, quanto ao local de origem e o uso ou não de terapia hormonal pelas pacientes.

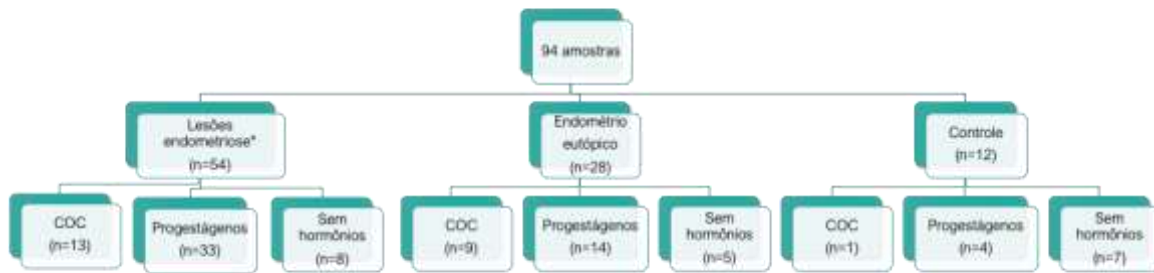


Figura 5: Fluxograma das amostras utilizadas no estudo.

*Tipos de lesões de endometriose: endometriomas, lesões peritoneais superficiais e lesões profundas infiltrativas.

3.2- A escolha das técnicas laboratoriais utilizadas no experimento

Para a quantificação da expressão dos miRNAs foi escolhida a técnica de RT-PCR, por ser considerada o padrão-ouro para tal análise, devido à celeridade e capacidade de amplificar exponencialmente quantidades pequenas de moléculas. A principal fragilidade da técnica está na normalização, já que os principais *housekeeping genes* usados como normalizadores podem não ter uma expressão estável em algumas condições e patologias. Ainda assim, este é considerado o método preferencial para validar a expressão dos miRNAs (Zampetaki, 2012).

Em um momento inicial, após revisão da literatura, elegemos o RNU44 como *housekeeping gene*, mas este mostrou-se indetectável na maior parte das amostras. Outros 3 candidatos a gene de controle interno foram testados (RNU6B, hsa-miR-148b-3p e hsa-miR-30e-5p), mas nenhum se mostrou apto. Por isso, optamos por analisar diretamente o *cycle threshold* (CT) dos miRNAs sem a subtração do CT de miRNAs de controle interno (Δ CT).

De forma análoga, por ser a metodologia mais utilizada para quantificação da expressão gênica, o RT-PCR também foi a técnica de eleição para a medida dos níveis de RNAm da 17 β HSD2 nas amostras estudadas.

Diferentemente dos estudos prévios já publicados na literatura, optamos por analisar a expressão proteica da enzima de forma quantitativa, através da técnica de *Western Blotting*, o que gera uma percepção mais fidedigna e direta da presença ou não da enzima. De forma

complementar, foi realizado ainda o estudo imunohistoquímico, que acrescenta dados acerca da localização da enzima nos compartimentos celulares.

3.3- Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR)

3.3.1- Extração de RNA total e tratamento com DNase

A expressão gênica da 17 β HSD2 foi analisada em todas as amostras obtidas (LE, EE e EC) enquanto a expressão dos miRNAs has-miR-26b-5p e has-miR-124-3p foi analisada em espécimes de lesões endometrióticas peritoneais superficiais (n=7) e amostras de endométrio eutópico de pacientes com endometriose (n=24).

Para tanto, realizou-se a extração de RNA total, de acordo com protocolo TRIzol (CAT15596018 - ThermoFisher Scientific, Massachusetts/EUA), sem alterações, em todas as amostras.

A fim de garantir mínima contaminação das amostras de RNA por ácido desoxirribonucleico (DNA), as mesmas foram tratadas com DNase I Amplification grade (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para tanto, as amostras foram quantificadas em NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA) e 1 μ g de amostra foi transferido para um novo tubo estéril de 0,5 mL RNase free. Ao 1 μ g de amostra foram adicionados 2 μ l de mix, composto por 1 μ l de enzima *DNase* e 1 μ l de tampão, e água de alta qualidade em quantidade suficiente para completar o volume final da reação de 10 μ l. A seguir, as amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e depois adicionou-se 1 μ l de *ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)* e realizou-se nova incubação a 65 °C. As amostras foram então requantificadas em *NanoDrop*.

3.3.2- Síntese de cDNA por transcrição reversa

A transcrição reversa para análise da expressão gênica da 17 β HSD2 foi realizada de acordo com o protocolo do kit de síntese de DNA complementar (cDNA) da Invitrogen® (SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR) a partir de 800 ng de RNA total das amostras.

Para analisar a expressão gênica dos miRNAs has-miR-26b-5p e has-miR-124-3p, a síntese de cDNA foi realizada utilizando-se um kit específico para miRNA (Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit code A28007. ThermoFisher), sem alterações.

Os cDNAs produzidos foram utilizados na reação em cadeia de polimerase em tempo real.

3.3.3- Oligonucleotídeos específicos

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) usados para amplificação de fragmentos dos genes da 17 β HSD2 e da S26 estão listados na **Tabela 3**. A proteína ribossomal S26 foi utilizada como controle interno (Almeida et al. 2021). Eles foram estudados e selecionados a partir da análise da sequência descrita no *GeneBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>), com auxílio da ferramenta de geração de primer da plataforma Primer-Blast do NIH (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores usados na RT-PCR em tempo real.

	Sequência (5'- 3')	GenBank ID
17 β HSD2-F	AGGCTGGCATCTTATGGCTC	NM_002153.3
17 β HSD2-R	TTCCCCACTTGGAAAGCTCC	
S26 - F	TTCCCCACTTGGAAAGCTCC	NM_002153.3
S26 - R	TTCCCCACTTGGAAAGCTCC	

Os primers foram sintetizados pela Invitrogen, recebidos liofilizados e, em seguida, ressuspensos em H₂O DEPC, livre de RNase e DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), para concentração final de 100 pmol/ μ L (concentração para estoque). Alíquotas de Primer Mix a 5 μ M foram preparadas no dia do experimento para serem utilizadas na PCR em tempo real.

3.3.4- Reação em cadeia de polimerase em tempo real

As amostras de cDNA previamente obtidas na RT foram submetidas a PCR em tempo real para avaliar a expressão gênica de 17 β HSD2. O volume final de reação foi 20 μ l, sendo a

reação composta de 2 µl de cDNA e 18 µl de solução mix formada por 7 µl de água para PCR (esterilizada e filtrada), 1 µl do primer mix (5 µM) (Invitrogen, Brasil) e 10 µl de SYBR Green® Master Mix (Applied Biosystems, Warrington WA, UK). Cada amostra foi ensaiada em duplicata. Foram utilizadas placas de 96 poços (ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), seladas com adesivo óptico (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O equipamento utilizado foi o ABI PRISM®7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington WA, UK) (LRH/HC-UFMG) no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 95 °C / 10 min.; [estágio 2] 40 ciclos de 95 °C / 15 segundos, 60 °C / 15 segundos e 72 °C / 20 segundos; [estágio 3] 95 °C / 15 segundos, 54 °C / 15 segundos e 95 °C / 15 segundos. As curvas de melting foram realizadas no final de cada ciclo para conferência da especificidade do fragmento amplificado. Os resultados foram corrigidos pela expressão do gene de controle interno s26.

As amostras de cDNA obtidas para analisar a expressão gênica dos miRNAs has-miR-26b-5p e has-miR-124-3p foram submetidas a PCR em tempo real utilizando ensaios padronizados e disponíveis comercialmente (TaqMan®, ThermoFisher Scientific, números de catálogo 480901_mir e 478418_mir). O volume final de reação foi 10 µl, sendo a reação composta de 2,5 µl de cDNA e 7,5 µl de solução mix formada por 2 µl de água para PCR (esterilizada e filtrada), 5 µl de Master Mix e 0,5 µl de sonda própria para miRNA. Cada amostra foi ensaiada em duplicata. Foram utilizadas placas de 96 poços. O equipamento utilizado foi o CFX96 Real-Time System- C1000 Touch Thermal Cycler.

3.4- Western Blotting

A análise da expressão da proteína 17βHSD2 por *Western Blotting* foi realizada conforme previamente descrito por Felix et al. (FB et al. 2021). As amostras de EE, LE e EC foram lisadas pela adição de 500 µL de solução de lise (0,5% p/v de NP-40, 100mM de Tris/HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,2 mM de EDTA, 1mM de NaVO₃, 1mM de DTT, 1mM de PMSF, 200mM de NaCl, 25 mM de NaF, leupeptina e aprotinina), e deixadas em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 12.000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C (centrífuga Jouan, modelo BR4i), sendo o sobrenadante aliquoteado.

Para realizar a dosagem de proteínas totais, foi utilizado o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) baseado no método de Bradford. O ensaio é realizado em uma microplaca de 96 poços, e consiste na adição de 2 μ L de cada amostra a 200 μ L do corante diluído 5 vezes em água destilada, em duplicatas. Paralelamente é realizado uma curva padrão utilizando como solução padrão BSA 1mg/mL. Após 5 minutos de incubação, a leitura é feita em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) a 595 nm. A absorbância das amostras é comparada com a absorbância da curva, com concentrações variando de 0.063 mg/mL a 2 mg/mL e os resultados são expressos em mg/mL.

Os extratos protéicos totais (50 μ g) foram desnaturados, misturando-se a amostra com tampão (10% SDS, 10% β -mercaptoetanol, 40% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 0.250M Tris/HCl pH 6,8) e a mistura mantida a 100°C por 5 minutos. Os extratos proteicos foram fracionados em gel de 10-15% de poliacrilamida/SDS e transferidos para membrana de nitrocelulose (HybondTM ECLTM, GE Healthcare). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com PBS-Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado, lavadas com PBS-Tween, e incubadas com o anticorpo de interesse, 17 β HSD2 (código sc-374150 Santa Cruz Biotechnology, Inc.), a 4°C overnight. Após nova lavagem com PBS/Tween e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário ligado à peroxidase, as membranas foram incubadas em solução reveladora ECL-Plus (GE Healthcare) e as bandas imunorreativas foram visualizadas usando ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories). As análises densitométricas foram realizadas usando o programa Image J.

3.5- Imunohistoquímica

3.5.1- Inclusão e corte

As amostras de LE, EE e EC previamente fixadas em *Histochoice*[®] foram submetidas à desidratação em concentrações crescentes de etanol (-70 a 100%) e, em seguida, diafinizados em xilol seguidos de inclusão em parafina a 60° C. Foram obtidas secções de 4-5 μ m de espessura, os quais foram submetidos aos procedimentos de imunohistoquímica.

3.5.2- Protocolo

Cortes dos tecidos alvos incluídos em parafina foram colocados em lâminas silanizadas e submetidos à coloração imunohistoquímica para detecção da proteína 17 β HSD

utilizando protocolo baseado em polímeros não biotinilados através do kit Novolink (Novocastra, *New Castle Upon Tyne*, Reino Unido). Os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em série decrescente de etanol e submetidos à recuperação antigênica em solução tampão EDTA 0,01M pH 8,0, aquecidos em forno microondas por 5 minutos. Após esfriamento, os cortes foram lavados com PBS e, então, submetidos ao bloqueio de peroxidase endógena em solução com o reagente peroxidase *block* seguido da incubação com o reagente *protein block*. Após essa etapa de bloqueio, os cortes foram incubados com o anticorpo primário (sc-374150, Santa Cruz Biotechnology, diluído 1:100), *overnight*. Como controle negativo, os cortes foram incubados apenas com PBS. Após lavagens, foi realizada incubação com o *post-primary*, seguido de incubação com o *polymer* (5µg/mL). A imunomarcação foi visualizada com a reação com 3,3'-diaminobenzidina contendo 0,01% de peróxido de hidrogênio em tampão do próprio kit. Finalmente, os cortes foram contracorados com hematoxilina, desidratados, e documentados por scanner de lâminas 3D HISTEC.

3.6- Análise estatística

No presente estudo, a análise da expressão dos microRNAs foi realizada através da comparação dos CTs (*threshold cycles*). Existe mais de uma maneira de interpretar os resultados da RT-PCR, sendo a comparação dos valores absolutos do CT uma delas. Quanto maior o CT, menor a expressão do gene de interesse no tecido analisado. Outra forma de avaliação, é o método comparativo conhecido como $2^{-\Delta\Delta Ct}$, para o qual é necessário um gene de controle interno (*housekeeping gene*) (Schmittgen, 2008). Como os candidatos a *housekeeping genes* testados no nosso estudo não atingiram um padrão estável de expressão, o primeiro método foi o escolhido.

Após o teste de distribuição de D'Agostino-Pearson indicar que os dados não seguem a distribuição normal, os resultados foram expressos como medianas e intervalos inter-quartil e submetidos aos testes não paramétricos de Mann-Whitney (dois grupos) ou Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn para comparações múltiplas. Utilizou-se o programa estatístico GraphPad Prism versão 6.0. Cálculo realizado *a priori* indicou que seriam necessárias no mínimo 8 amostras por grupo para alcançar o poder estatístico mínimo de 80% na detecção de diferenças inter-grupo da ordem de 1,5 desvio-padrão com nível de confiança de 95% (Machin et al. 1997).

IV- RESULTADOS

4.1- Análise da expressão dos miRNAs has-miR-26b-5p e has-miR-124-3p por RT-PCR

Não foi encontrada diferença na expressão do miRNA has-miR-26b-5p entre o endométrio eutópico de pacientes com endometriose e as lesões de endometriose peritoneal superficial. De forma análoga, a expressão do miRNA has-miR-124-3p também foi semelhante entre EE e LE (**Gráfico 1**).

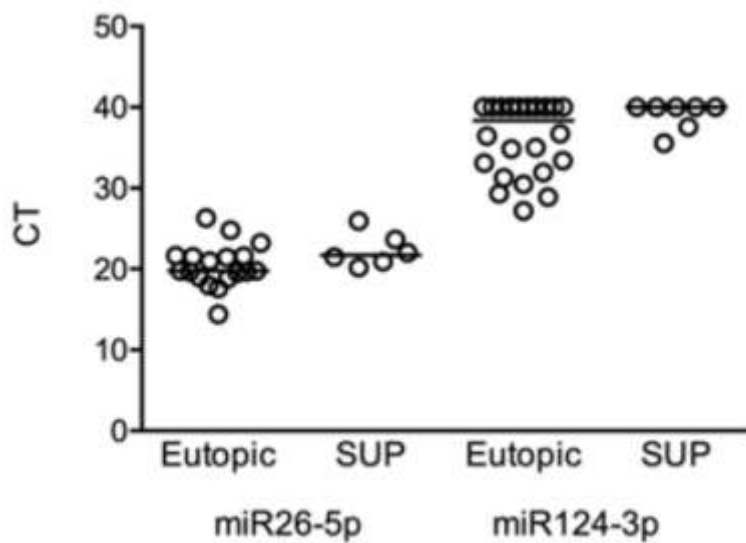


Gráfico 1: Expressão dos miRNAs no endométrio eutópico de pacientes com endometriose vs. lesões de endometriose peritoneal superficial (SUP). À esquerda do gráfico, não se evidenciou diferença na expressão do has-miR-26b-5p entre os grupos. À direita, também não houve diferença da expressão do has-miR-124-3p entre os dois grupos estudados.

4.2- Análise da expressão do RNAm 17 β HSD2 por RT-PCR

Em uma primeira análise, excluímos as amostras sob efeito recente de terapia hormonal. A expressão gênica do 17 β HSD2 em nível de RNAm foi observada nos três grupos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles (**Gráfico 2**).

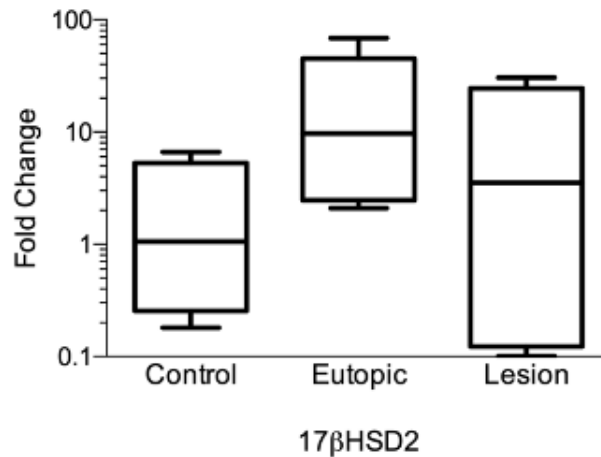


Gráfico 2 - Expressão de RNAm do 17 β HSD2 em amostras sem influência de tratamento hormonal.

Uma segunda análise dos achados foi realizada, incluindo as amostras das pacientes que estavam sob uso de medicação hormonal (COC ou progestagênio isolado). Observamos o mesmo padrão notado anteriormente. Houve expressão do RNAm de 17 β HSD2 tanto nas lesões, como nos endométrios eutópicos pareados, não tendo sido observada diferença entre os dois grupos. A expressão nas amostras de endométrio de pacientes sem endometriose também foi evidenciada, não havendo diferença, quando comparada aos outros dois grupos (**Gráfico 3**).

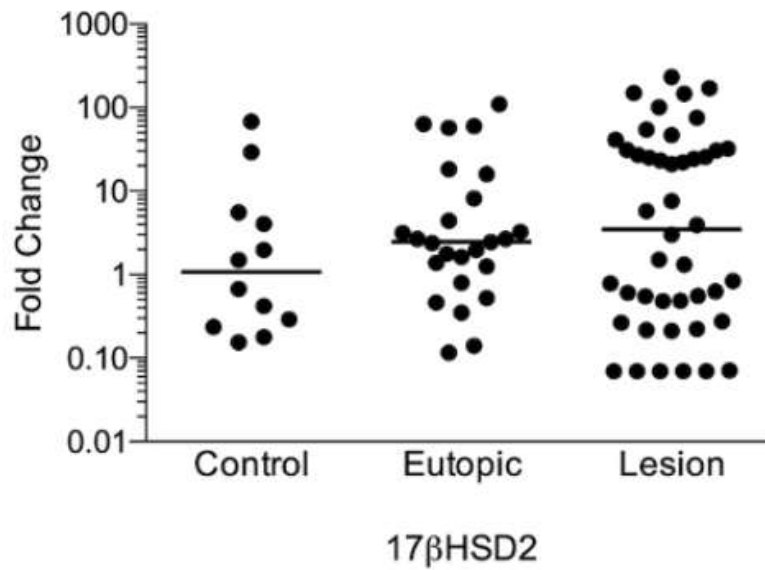


Gráfico 3: Expressão do RNAm da 17βHSD2 por RT-PCR. (amostras com e sem tratamento hormonal).

Uma terceira análise foi realizada para avaliar se, nas amostras sob influência de progestagênios isolados, haveria alteração no padrão da expressão de RNAm da enzima. Novamente, foi constatada expressão do RNAm nos 3 grupos: LE, EE e EC. Não houve diferença estatisticamente significativa entre eles.

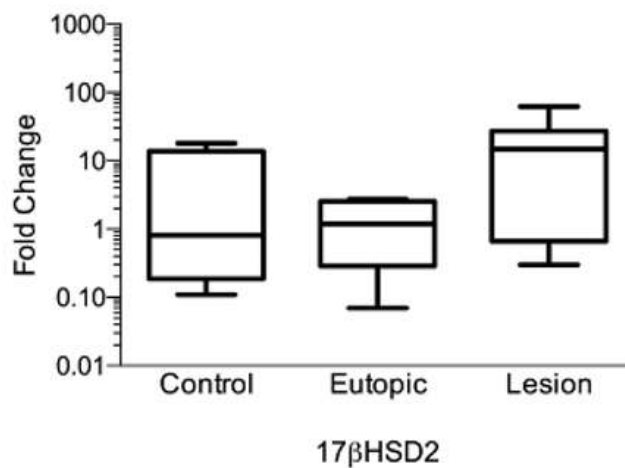


Gráfico 4: Expressão de RNAm do 17βHSD2 em amostras de pacientes em uso de progestagênio isolado.

Por fim, realizamos uma avaliação apenas nas amostras de LE, que foram divididas em 3 subgrupos, considerando o *status* hormonal das pacientes: A) sem terapia hormonal; B) em uso de COC; C) em uso de progestagênio isolado. Novamente, verificamos a existência de expressão do RNAm em todos os subgrupos. O subgrupo de lesões sob influência de progestágenios isolados expressou mais RNAm de 17BHS2 do que aquelas lesões sob influência de COC ou sem influência de terapia hormonal, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

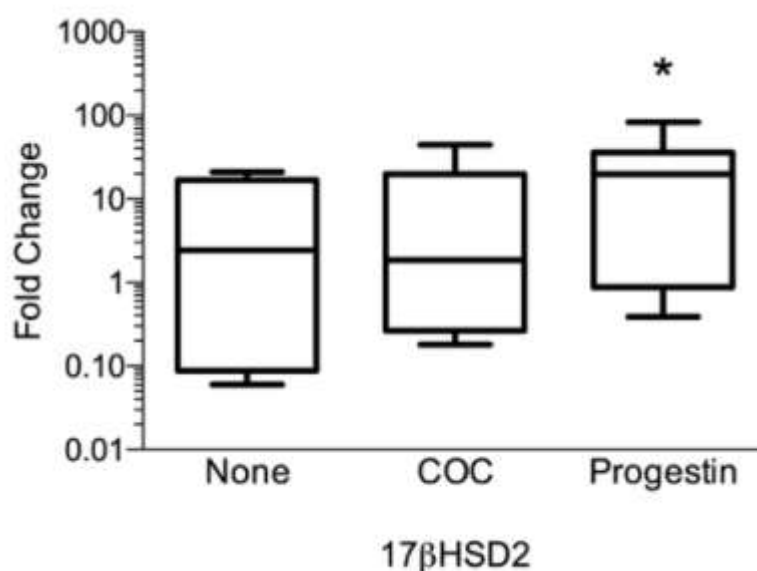


Gráfico 5: Expressão de RNAm do 17βHSD2 nas lesões, segundo exposição hormonal. Foi detectada expressão aumentada no grupo de amostras sob influência de progestagênio isolado com diferença estatisticamente significativa em relação aos outros dois grupos (COC e ausência de terapia hormonal). * $p < 0,05$.

4.3- Avaliação da expressão da proteína 17βHSD2 por *Western Blotting*

Através da técnica de *Western Blotting* foi possível observar a presença da proteína 17βHSD2 em LE, EE e EC. O Gráfico 6 mostra a expressão da proteína em comparação com o controle beta-actina, nos 3 grupos estudados.

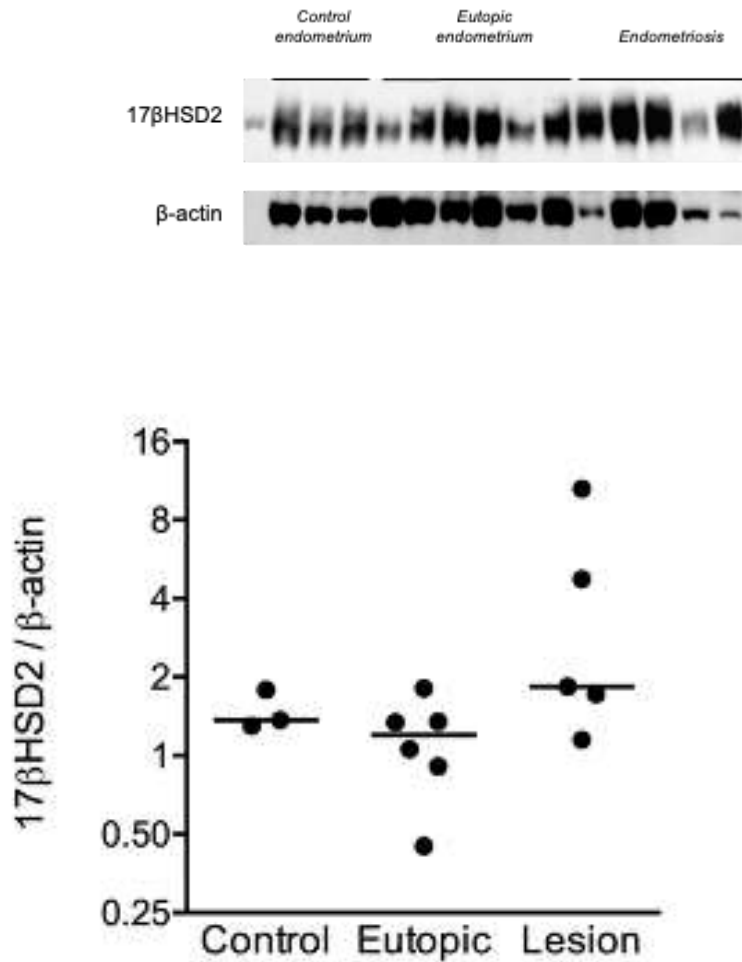


Gráfico 6: Expressão proteica do 17βHSD2 nas amostras de lesões de endometriose, de endométrio eutópico e endométrio de pacientes sem endometriose.

4.4- Avaliação da expressão da proteína 17βHSD2 por imunohistoquímica

Ao todo, foram preparados 30 cortes para análise IMH. As imagens foram cuidadosamente avaliadas e classificadas em três categorias, conforme marcação do anticorpo: 1) expressão de 17βHSD2 ausente; 2) expressão de 17βHSD2 leve; 3) expressão de 17βHSD2 moderada. Os resultados são mostrados no **Gráfico 7**. Não foi possível determinar diferença na frequência da expressão da 17βHSD2 nas lesões, quando comparadas às amostras de endométrio eutópico pareado.

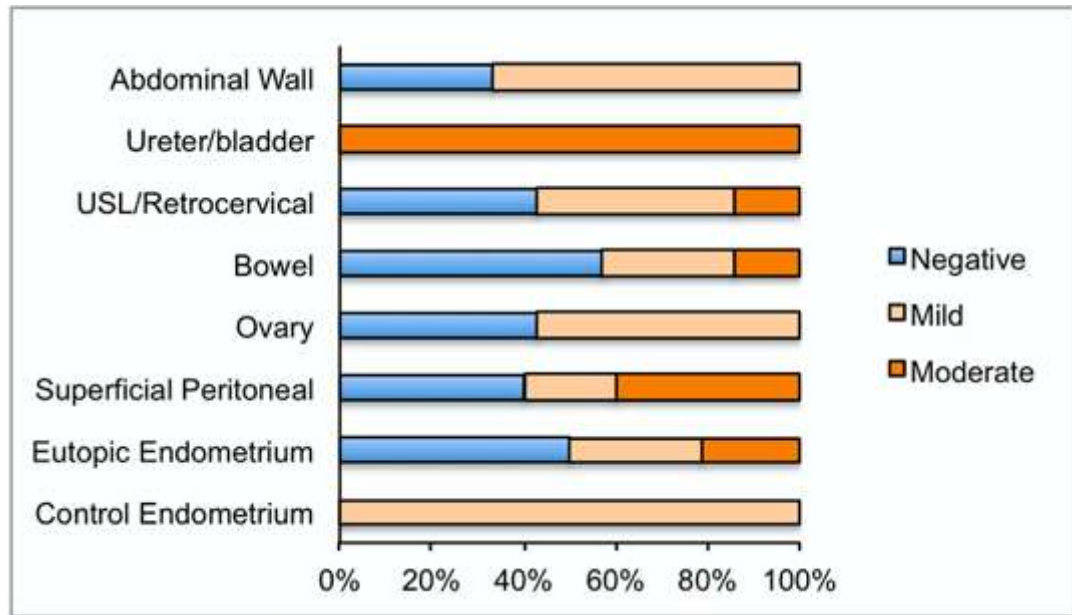


Gráfico 7: Frequência de marcação da proteína 17 β HSD2 nos diferentes tipos de lesão, no endométrio eutópico e no endométrio controle.

Na **Figura 6**, exemplares de cortes estudados pela IMH demonstram a presença da proteína 17 β HSD2 nos diferentes tipos de amostras. Além da constatação da expressão da enzima em graus variados, tanto no endométrio eutópico, quanto no ectópico, pôde-se ainda avaliar uma marcação mais acentuada em epitélio glandular, embora também tenha sido evidenciado em menor proporção no estroma.

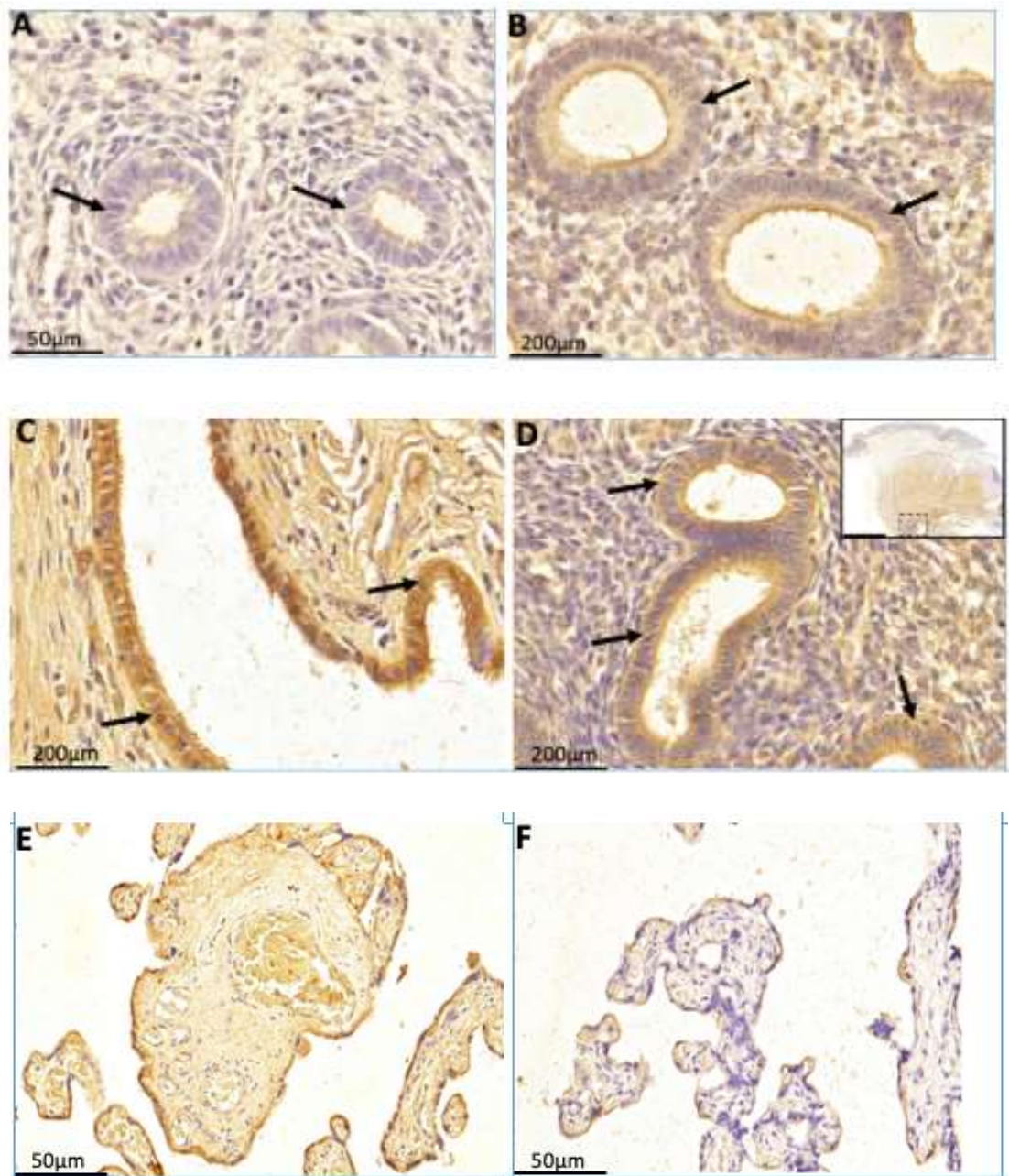


Figura 6: Cortes de imunohistoquímica. A- Endométrio controle; B- Endométrio eutópico de paciente com endometriose; C- Lesão de endometriose de bexiga; D- Lesão de endometriose de intestino; E- Placenta: controle positivo; F- Placenta: controle negativo.

V- DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram não haver diferença na expressão dos miRNAs has-miR-26b-5p e has-miR-124-3p entre lesões de endometriose e endométrio eutópico de pacientes com a doença. Com isso, não pudemos comprovar que a interferência epigenética de miRNAs possa justificar a ausência da proteína 17 β HSD2 na endometriose.

A ideia inicial do presente estudo, conforme anteriormente explanada, baseou-se no estudo pioneiro de Zeitoun *et al.* (1998), que sugeriu ausência da enzima 17 β HSD2 nas lesões de endometriose, mas não no endométrio eutópico pareado. Levamos, ainda, em consideração a possível existência de expressão do gene no nível de RNAm. Estudando-se os miRNAs que têm como alvo o 17 β HSD2 (conhecidos até o momento), a nossa hipótese de bloqueio pós-transcricional do gene por excesso desses miRNAs nas lesões endometrióticas foi, portanto, refutada.

Embora seja ainda um campo do conhecimento bastante novo, o estudo dos miRNAs é de grande interesse. Estima-se que 30% dos genes humanos sejam alvos potenciais para os miRNAs (Filigheddu *et al.* 2010). Estes moduladores da expressão gênica têm sido identificados como atores em diversos processos patológicos, incluindo as doenças ginecológicas (Santamaria and Taylor 2014). A possibilidade de detecção dos mesmos em fluidos corporais, como plasma, soro, urina e fluxo menstrual torna os miRNAs excelentes candidatos a biomarcadores de doenças. O entendimento de como estas pequenas moléculas atuam em patologias de difícil detecção e manejo, como a endometriose, é fundamental e traz grande expectativa para o desenvolvimento futuro de ferramentas diagnósticas menos invasivas e novas opções terapêuticas (Marí-Alexandre *et al.* 2016).

Estudos acerca do papel dos miRNAs na endometriose têm sido realizados nos últimos anos e é provável que estes *non-coding* RNAs devam estar ligados a mais de um mecanismo etiopatogênico da doença, como: angiogênese, proliferação, morte e remodelamento celular (Marí-Alexandre *et al.* 2016; Ohlsson Teague *et al.* 2009; Filigheddu *et al.* 2010; Teague, Print and Hull 2010). Em 2014, Braza-Boils *et al.* identificaram um padrão diferencial de expressão de miRNAs potencialmente relacionados a importantes fatores angiogênicos e fibrinolíticos, ao comparar endometriomas e endométrio eutópico das mesmas pacientes (Braza-Boils *et al.* 2014). Um outro trabalho, comparando endometriomas com endométrio controle proliferativo, proveniente de mulheres com infertilidade ou cisto ovariano, encontrou uma hiporregulação dos miRNAs hsa-miR-483-5p e hsa-miR-629 no grupo com

endometriose, o que talvez possa estimular uma expressão exagerada de fatores de promoção de crescimento relacionados à inflamação (Laudanski et al. 2013).

Em nosso estudo, na análise dos miRNAs foram incluídas amostras independentemente da fase do ciclo e da presença ou não de tratamento hormonal com progestogênios isolados ou associados com estrogênio. Apesar disso, notamos um padrão de expressão bastante estável em ambos os miRNAs testados. Um estudo prévio, realizado em 2009, que analisou a assinatura dos miRNAs em tecidos ectópicos e eutópicos pareados, encontrou 22 miRNAs diferencialmente expressos entre os dois grupos (miR-145, miR-143, miR-99a, miR-99b, miR-126, miR-100, miR-125b, miR-150, miR-125a, miR-223, miR-194, miR-365, miR-29c and miR-1, miR-200a, miR-141, miR-200b, miR-142-3p, miR-424, miR-34c, miR-20a e miR-196b), dos quais 6 puderam ser validados pelo RT-PCR. Neste estudo, não foi notada diferença significativa dos perfis de expressão nas diferentes fases do ciclo (Ohlsson Teague et al. 2009).

Apesar destes achados, cabe pontuar que, sendo o endométrio um tecido responsivo aos estímulos dos hormônios esteroides e sabendo-se que inúmeros genes têm sua expressão variável ao longo do ciclo menstrual, é muito provável que concomitantemente às alterações morfológicas e funcionais cíclicas do endométrio, os níveis de alguns miRNAs também variem (Munro et al. 2010). Kuokkanen *et. al.*, em 2010, utilizando tecnologia de *microarray* e análise por bioinformática, propuseram identificar miRNAs potencialmente envolvidos na regulação do endométrio normal por E2 e P4. Ao avaliarem o padrão de expressão de RNAm e miRNA de forma simultânea, em dois momentos distintos do ciclo (fase proliferativa tardia e fase secretora média), encontraram 12 miRNAs diferencialmente expressos (MIR29B, MIR29C, MIR30B, MIR30D, MIR31, MIR193A-3P, MIR203, MIR204, MIR200C, MIR210, MIR582-5P e MIR345) (Kuokkanen et al. 2010). Apesar destes achados, a regulação epigenética ao longo do ciclo menstrual é ainda muito pouco conhecida (Munro et al. 2010).

A análise dos miRNAs tem como grande obstáculo a dificuldade em estabelecer um gene de controle que possibilite uma análise mais rica de seus achados (Zampetaki and Mayr 2012). A testagem de múltiplos candidatos a *housekeeping genes* gera importantes limitações financeiras e de tempo. No nosso trabalho, foram testadas 4 opções de possíveis controles, escolhidos após busca da literatura, porém nenhum se mostrou adequado.

Até onde temos conhecimento, o presente trabalho foi o primeiro a testar miRNAs relacionados à expressão gênica do 17 β HSD2 na endometriose. Apesar do achado negativo no que tange a proposta inicial deste estudo, consideramos que o conhecimento obtido através da presente análise seja de grande valia e deva ser extrapolado em estudos futuros, incluindo um

rol ainda maior e mais variado de amostras. Embora a racionalidade que baseou nossa hipótese tenha nos levado a priorizar a avaliação dos miRNAs nas lesões e no endométrio eutópico de pacientes com endometriose, a avaliação de endométrios de mulheres saudáveis deve ser incluída em avaliações futuras. Por fim, faz-se necessária a realização de estudos adicionais que consigam definir um *housekeeping gene* universal para a análise dos miRNAs no endométrio.

Havendo finalizado a avaliação dos miRNAs, passamos a um segundo momento do nosso trabalho. A partir de cuidadosa revisão da literatura, notamos que: 1) a teoria da deficiência da enzima 17 β HSD2 na endometriose é entendida pela maioria dos estudos de revisão como a mais aceita e o estudo de Zeitoun *et al.*, publicado em 1998, segue sendo o mais utilizado como principal referência para o assunto; 2) Estudos posteriores mostraram resultados variados: alguns confirmaram uma tendência à menor expressão de RNAm da 17 β HSD2 nas lesões do que no controle, enquanto outros mostraram resultado inverso; 3) Poucos estudos analisaram a expressão do gene 17 β HSD2 em nível proteico e, quando testado, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica.

A partir daí, percebemos que restam inúmeras lacunas no entendimento da expressão da 17 β HSD2 na endometriose. Propusemos, então, a realização de novos experimentos para ampliar o entendimento da expressão da referida enzima, mas agora testando um rol mais amplo e variado de amostras provenientes de mulheres com e sem endometriose.

Diferente de Zeitoun *et al.*, não pudemos comprovar, através dos nossos achados, a ausência da enzima nas LE. Pelo contrário, identificamos a expressão gênica de 17 β HSD2 tanto em nível de RNAm quanto em nível protéico.

Assim como nós, Smuc *et al.*, em 2007 observaram níveis semelhantes de RNAm ao comparar endometriose ovariana e endométrio controle (Tina Šmuc et al. 2007). No mesmo ano, Carneiro *et al.*, utilizando apenas amostras na fase proliferativa do ciclo, detectaram níveis aumentados de RNAm de 17 β HSD2 em lesões de peritônio e ovário comparadas ao endométrio de controles. Este último estudo ainda visualizou a presença da proteína por imunohistoquímica no epitélio glandular endometrial dos tecidos ectópico e eutópico de pacientes com endometriose. Já no grupo controle, a proteína foi quase indetectável. Diante destes achados, os autores sugeriram que nas pacientes com endometriose não haveria um *downregulation* adequado da enzima 17 β HSD2 na fase proliferativa, como é visto no endométrio normal (Carneiro et al. 2007).

Outros estudos já haviam mostrado que no endométrio saudável a enzima 17 β HSD2 provavelmente sofre *dowregulation* na fase proliferativa do ciclo menstrual. A partir do

aumento dos receptores de P4 no estroma, na segunda fase do ciclo haveria um estímulo para aumento da expressão da enzima no epitélio glandular (Casey, MacDonald, and Andersson 1994; Dassen et al. 2007; Cheng et al. 2007). No estudo de Zeitoun, os autores não encontraram diferença na expressão dos receptores de P4 e estrogênio ao longo do ciclo. Portanto, sugeriram que a ausência da 17 β HSD2 nas lesões não poderia ser explicada pela baixa expressão dos receptores de P4 local, mas sim pela resistência à ação do hormônio (Zeitoun et al. 1998).

Matsuzaki *et al.* analisaram amostras de endometriose profunda obtidas por microdissecção a laser. Os controles eram mulheres férteis, submetidas a ligadura ou reversão tubária. A expressão de RNAm de 17 β HSD2 foi detectada em células epiteliais de quase todas as amostras de endométrio eutópico de pacientes com endometriose e dos controles, tanto na fase proliferativa como secretora. Os transcritos foram identificados em 50% das lesões, sem diferença quanto às fases do ciclo (Matsuzaki, Canis, Pouly, Déchelotte, et al. 2006). Em um outro estudo dos mesmos autores, porém utilizando-se amostras de endometrioma, detectou-se aumento significativo ($p < 0,03$) de expressão de RNAm nas LE em relação ao EE, na fase proliferativa (Matsuzaki, Canis, Pouly, Botchorishvili, et al. 2006).

Como podemos perceber, os estudos são bastante heterogêneos em seus achados e metodologias. Não fica claro se na endometriose a expressão da enzima seria influenciada pelas fases do ciclo, assim como parece ocorrer no endométrio normal. Talvez um *downregulation* da enzima ocorra apenas em tipos específicos de lesões. Fazendo uma analogia com a aromatase, cuja expressão aberrante parece ocorrer de forma diversa nos diferentes tipos de endometriose, é possível que o microambiente de cada tipo de lesão tenha um padrão próprio de expressão gênica das enzimas responsáveis pela conversão de precursores em estrogênios (Heilier et al. 2006).

Importante ressaltar que utilizamos, dentro da nossa coorte de amostras disponível para análise, espécimes provenientes de pacientes com e sem exposição à terapia hormonal. Nos últimos anos, o tratamento da endometriose tem sofrido uma quebra de paradigmas e temos tido cada vez mais liberalidade em, havendo forte suspeita clínica da doença e, mediante achados em exames de imagem (ex.: ultrassonografia com preparo intestinal) realizados por profissionais com ampla expertise, instituir os tratamentos hormonais empíricos com progestágenos isolados, COC e análogos do GnRH. Desta forma, a grande maioria das pacientes com indicação cirúrgica para tratamento da endometriose atualmente, encontra-se em uso de alguma terapia hormonal.

Obviamente, a obtenção de amostras de lesão e endométrio eutópico de pacientes reais para a realização de estudos científicos torna-se um desafio cada vez maior, visto o compromisso ético de não prejudicar a paciente em seu tratamento medicamentoso, sendo inaceitável a suspensão da medicação sem que haja indicação clínica para tanto.

Por um lado, o uso de COC ou progestogênio isolado em muitas das pacientes da nossa população de estudo, embora justificável, poderia ser interpretado como uma limitação do presente trabalho, já que realizamos a análise de uma enzima ligada à catalisação de esteroides hormonais. Portanto, nossos resultados devem sempre ser analisados e interpretados levando-se este dado em consideração. Por outro lado, a observação do comportamento da expressão gênica da 17 β HSD2 sob os diversos estímulos hormonais, bem como na ausência de tais estímulos, traz um panorama muito rico de informações que ajudarão a compreender a complexidade dos mecanismos envolvidos, indo além do que já foi testado e inferido até o momento.

Dassen *et al.* expuseram amostras de endométrio normal a três tipos de tratamento: E2 isolado; P4 (progesterona) isolada; E2+P4. Tanto a associação E2+ P4 quanto a P4 isolada foram capazes de aumentar a transcrição gênica do 17 β HSD2 das células endometriais nas fases menstrual e proliferativa tardia, sendo que houve um aumento maior na fase proliferativa quando comparado à fase menstrual. Mas não houve confirmação dos achados em nível de proteína (Dassen et al. 2007). Em nosso estudo, percebemos um aumento dos transcritos da 17 β HSD2 nas lesões de endometriose que estavam sob efeito de progestágenos isolados. Curiosamente, o mesmo não foi notado na presença de associação com estrogênio (grupo em uso de COC).

Já Kitawaki *et al.* em 2000, observaram em cultivos celulares que a presença de progestínicos resultou na estimulação de 17 β HSD2, via receptores de P4, em endométrios com doenças estrogênio-dependentes (endometriose, adenomiose e leiomiomatose), mas não no endométrio livre de doença. Com isso, eles sugeriram que o paradigma visto em estudos anteriores, de aumento da 17 β HSD2 na fase secretora, se restringiria a endométrios doentes (Kitawaki et al. 2000). A obtenção de controles saudáveis é um desafio nos estudos experimentais sobre endometriose e muitas vezes são utilizadas amostras de pacientes com outras patologias que poderiam talvez influenciar o ambiente endometrial (infertilidade, leiomiomatose uterina, pólipos endometriais). Além disso, mesmo nas pacientes consideradas “saudáveis”, uma exclusão absoluta de quadros leves e assintomáticos de endometriose é pouco provável. Assim, este possível viés deve ser levado em consideração à análise do nosso e de outros estudos anteriores.

Segundo os achados de Kitawaki, e os nossos próprios resultados, verificamos que houve um aumento de expressão da 17 β HSD2 nas lesões de endometriose que tiveram influência da progesterona (no nosso caso, apenas com o hormônio isolado) (Kitawaki et al. 2000). Estes achados vão de encontro à ideia de que a resistência à progesterona vista na endometriose bloquearia a expressão da enzima. Mas acreditamos que o processo de resistência à progesterona na doença não dependa de apenas um mecanismo, sendo bastante plausível a participação de outros genes e, quiçá, a influência de microRNAs (Lessey 2010).

VI- CONCLUSÕES

Concluimos, diante de todos os dados apresentados, que não é possível sustentar a teoria de ausência de expressão da 17 β HSD2 nas lesões de endometriose. Visto a complexidade da matéria, concluimos que, caso exista um *dowregulation* da proteína no tecido ectópico, este achado não deve ser considerado um evento universal. Possivelmente a regulação de sua expressão dependa de muitos outros fatores. O comportamento da enzima nos diferentes tipos de lesão, em diferentes fases do ciclo e sob diversos estímulos hormonais, ainda deverá ser mais bem explorado em estudos futuros.

Apesar de não termos conseguido demonstrar a influência dos miRNAs estudados na expressão da 17 β HSD2, acreditamos que os *non-coding* RNAs sejam peças fundamentais na regulação esteroide do ambiente endometrial. O reconhecimento de potenciais distúrbios na expressão dos miRNAs na endometriose é necessário e poderá contribuir para o entendimento e manejo da doença no futuro.

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida CP, Silveira CO, Ferreira EF, Ferreira MC, Oliveira GG, Veloso ES, Silva FHS, Coelho SS, Moraes LM, Reis FM, Del Puerto HL. Pro-caspase-3 is constitutively expressed in luteinized granulosa cells from women undergoing controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Acta Histochem.* 2021 Feb;123(2):151670. doi: 10.1016/j.acthis.2020.151670. Epub 2020 Dec 25. PMID: 33360490.

Attar E, Tokunaga H, Imir G, Yilmaz MB, Redwine D, Putman M, Gurates B, Attar R, Yaegashi N, Hales DB, Bulun SE. Prostaglandin E2 via steroidogenic factor-1 coordinately regulates transcription of steroidogenic genes necessary for estrogen synthesis in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Feb;94(2):623-31. doi: 10.1210/jc.2008-1180. Epub 2008 Nov 11. PMID: 19001523; PMCID: PMC2646521.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281-97. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5. PMID: 14744438.

Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 2009 Apr 1;23(7):781-3. doi: 10.1101/gad.1787609. PMID: 19339683; PMCID: PMC3959995.

Borghese B, Zondervan KT, Abrao MS, Chapron C, Vaiman D. Recent insights on the genetics and epigenetics of endometriosis. *Clin Genet.* 2017 Feb;91(2):254-264. doi: 10.1111/cge.12897. Epub 2016 Nov 30. PMID: 27753067.

Braza-Boils A, Marí-Alexandre J, Gilibert J, Sánchez-Izquierdo D, España F, Estellés A, Gilibert-Estellés J. MicroRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. *Hum Reprod.* 2014 May;29(5):978-88. doi: 10.1093/humrep/deu019. Epub 2014 Mar 6. PMID: 24608518.

Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, Simpson E, Sasano H. Aromatase as a therapeutic target in endometriosis. *Trends Endocrinol Metab.* 2000 Jan-Feb;11(1):22-7. doi: 10.1016/s1043-2760(99)00216-7. PMID: 10652502.

Bulun SE, Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Sebastian S. Estrogen production and metabolism in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Mar;955:75-85; discussion 86-8, 396-406. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb02767.x. PMID: 11949967.

Bulun SE, Yilmaz BD, Sison C, Miyazaki K, Bernardi L, Liu S, Kohlmeier A, Yin P, Milad M, Wei J. Endometriosis. *Endocr Rev.* 2019 Aug 1;40(4):1048-1079. doi: 10.1210/er.2018-00242. PMID: 30994890; PMCID: PMC6693056.

Burney RO, Hamilton AE, Aghajanova L, Vo KC, Nezhat CN, Lessey BA, Giudice LC. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2009 Oct;15(10):625-31. doi: 10.1093/molehr/gap068. Epub 2009 Aug 19. PMID: 19692421; PMCID: PMC2744474.

Carneiro MM, Morsch DM, Camargos AF, Spritzer PM, Reis FM. Expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in pelvic endometriosis. *Gynecol Endocrinol.* 2007 Apr;23(4):188-92. doi: 10.1080/09513590701200850. PMID: 17505937.

Casey ML, MacDonald PC, Andersson S. 17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2: chromosomal assignment and progestin regulation of gene expression in human endometrium. *J Clin Invest.* 1994 Nov;94(5):2135-41. doi: 10.1172/JCI117569. PMID: 7962560; PMCID: PMC294662.

Cheng, YH, Imir A, Fenkci V, Yilmaz MB, Bulun SE. 2007. Stromal Cells of Endometriosis Fail to Produce Paracrine Factors That Induce Epithelial 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Gene and Its Transcriptional Regulator Sp1: A Mechanism for Defective Estradiol Metabolism. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2007 April, 196 (4): 391.e1-391.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.12.014>.

Chou CH, Shrestha S, Yang CD, Chang NW, Lin YL, Liao KW, Huang WC, Sun TH, Tu SJ, Lee WH, Chiew MY, Tai CS, Wei TY, Tsai TR, Huang HT, Wang CY, Wu HY, Ho SY, Chen PR, Chuang CH, Hsieh PJ, Wu YS, Chen WL, Li MJ, Wu YC, Huang XY, Ng FL, Buddhakosai W, Huang PC, Lan KC, Huang CY, Weng SL, Cheng YN, Liang C, Hsu WL, Huang HD. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 4;46(D1):D296-D302. doi: 10.1093/nar/gkx1067. PMID: 29126174; PMCID: PMC5753222.

Dalsgaard T, Hjordt Hansen MV, Hartwell D, Lidegaard O. Reproductive prognosis in daughters of women with and without endometriosis. *Hum Reprod.* 2013 Aug;28(8):2284-8. doi: 10.1093/humrep/det231. Epub 2013 May 21. PMID: 2369654

Dassen H, Punyadeera C, Kamps R, Delvoux B, Van Langendonck A, Donnez J, Husen B, Thole H, Dunselman G, Groothuis P. Estrogen metabolizing enzymes in endometrium and endometriosis. *Hum Reprod.* 2007 Dec;22(12):3148-58. doi: 10.1093/humrep/dem310. Epub 2007 Oct 6. PMID: 17921479.

Donnez J, Nisolle M, Smoes P, Gillet N, Beguin S, Casanas-Roux F. Peritoneal endometriosis and "endometriotic" nodules of the rectovaginal septum are two different entities. *Fertil Steril.* 1996 Sep;66(3):362-8. PMID: 8751730.

Felix FB, Vago JP, Fernandes DO, Martins DG, Moreira IZ, Gonçalves WA, Costa WC, Araújo JMD, Queiroz-Junior CM, Campolina-Silva GH, Soriani FM, Sousa LP, Grespan R, Teixeira MM, Pinho V. Biochanin A Regulates Key Steps of Inflammation Resolution in a Model of Antigen-Induced Arthritis via GPR30/PKA-Dependent Mechanism. *Front Pharmacol.* 2021 Apr 26;12:662308. doi: 10.3389/fphar.2021.662308. PMID: 33995086; PMCID: PMC8114065.

Ferrero S, Pretta S, Bertoldi S, Anserini P, Remorgida V, Del Sette M, Gandolfo C, Ragni N. Increased frequency of migraine among women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2004 Dec;19(12):2927-32. doi: 10.1093/humrep/deh537. Epub 2004 Oct 28. PMID: 15513980.

Filigheddu N, Gregnanin I, Porporato PE, Surico D, Perego B, Galli L, Patrignani C, Graziani A, Surico N. Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:369549. doi: 10.1155/2010/369549. Epub 2010 Mar 10. PMID: 20300586; PMCID: PMC2837904.

Gibson DA, Simitsidellis I, Collins F, Saunders PTK. Endometrial Intracrinology: Oestrogens, Androgens and Endometrial Disorders. *Int J Mol Sci*. 2018 Oct 22;19(10):3276. doi: 10.3390/ijms19103276. PMID: 30360364; PMCID: PMC6214123.

Gilabert-Estelles J, Braza-Boils A, Ramon LA, Zorio E, Medina P, Espana F, Estelles A. Role of microRNAs in gynecological pathology. *Curr Med Chem*. 2012;19(15):2406-13. doi: 10.2174/092986712800269362. PMID: 22455593. 19 (15): 2406–13. <https://doi.org/10.2174/092986712800269362>.

Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004 Nov 13-19;364(9447):1789-99. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17403-5. PMID: 15541453.

Guo SW. Epigenetics of endometriosis. *Mol Hum Reprod*. 2009 Oct;15(10):587-607. doi: 10.1093/molehr/gap064. Epub 2009 Aug 3. PMID: 19651637.

Hadfield R, Mardon H, Barlow D, Kennedy S. Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. *Hum Reprod*. 1996 Apr;11(4):878-80. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019270. PMID: 8671344.

Hawkins SM, Creighton CJ, Han DY, Zariff A, Anderson ML, Gunaratne PH, Matzuk MM. Functional microRNA involved in endometriosis. *Mol Endocrinol*. 2011 May;25(5):821-32. doi: 10.1210/me.2010-0371. Epub 2011 Mar 24. PMID: 21436257; PMCID: PMC3082329.

Heilier JF, Donnez O, Van Kerckhove V, Lison D, Donnez J. Expression of aromatase (P450 aromatase/CYP19) in peritoneal and ovarian endometriotic tissues and deep endometriotic (adenomyotic) nodules of the rectovaginal septum. *Fertil Steril*. 2006 May;85(5):1516-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.10.041. Epub 2006 Mar 29. PMID: 16566930.

Huhtinen K, Stähle M, Perheentupa A, Poutanen M. Estrogen biosynthesis and signaling in endometriosis. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Jul 25;358(2):146-54. doi: 10.1016/j.mce.2011.08.022. Epub 2011 Aug 22. PMID: 21875644.

Jansson A. 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009 Mar;114(1-2):64-7. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.12.012. Epub 2009 Jan 9. PMID: 19167496.

Kitawaki J, Koshihara H, Ishihara H, Kusuki I, Tsukamoto K, Honjo H. Progesterone induction of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 during the secretory phase occurs in the endometrium of estrogen-dependent benign diseases but not in normal endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Sep;85(9):3292-6. doi: 10.1210/jcem.85.9.6829. PMID: 10999824.

Konings G, Brentjens L, Delvoux B, Linnanen T, Cornel K, Koskimies P, Bongers M, Kruitwagen R, Xanthoulea S, Romano A. Intracrine Regulation of Estrogen and Other Sex Steroid Levels in Endometrium and Non-gynecological Tissues; Pathology, Physiology, and Drug Discovery. *Front Pharmacol*. 2018 Sep 19;9:940. doi: 10.3389/fphar.2018.00940. PMID: 30283331; PMCID: PMC6157328.

Kuokkanen S, Chen B, Ojalvo L, Benard L, Santoro N, Pollard JW. Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biol Reprod*. 2010 Apr;82(4):791-801. doi:

10.1095/biolreprod.109.081059. Epub 2009 Oct 28. PMID: 19864316; PMCID: PMC2842492.

Labrie F. Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol*. 1991 Jul;78(3):C113-8. doi: 10.1016/0303-7207(91)90116-a. PMID: 1838082.

Laganà AS, Garzon S, Götte M, Viganò P, Franchi M, Ghezzi F, Martin DC. The Pathogenesis of Endometriosis: Molecular and Cell Biology Insights. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 10;20(22):5615. doi: 10.3390/ijms20225615. PMID: 31717614; PMCID: PMC6888544.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y. PMID: 8252621.

Lessey BA. Fine tuning of endometrial function by estrogen and progesterone through microRNAs. *Biol Reprod*. 2010 Apr;82(4):653-5. doi: 10.1095/biolreprod.110.083667. Epub 2010 Feb 3. PMID: 20130265.

Liang Y, Xie H, Wu J, Liu D, Yao S. Villainous role of estrogen in macrophage-nerve interaction in endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018 Dec 5;16(1):122. doi: 10.1186/s12958-018-0441-z. PMID: 30518376; PMCID: PMC6282253.

Lu ML, Huang YW, Lin SX. Purification, reconstitution, and steady-state kinetics of the trans-membrane 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2. *J Biol Chem*. 2002 Jun 21;277(25):22123-30. doi: 10.1074/jbc.M111726200. Epub 2002 Apr 8. PMID: 11940569.

Marí-Alexandre J, García-Oms J, Barceló-Molina M, Gilabert-Aguilar J, Estellés A, Braza-Boïls A, Gilabert-Estellés J. MicroRNAs and angiogenesis in endometriosis. *Thromb Res*. 2015 Feb;135 Suppl 1:S38-40. doi: 10.1016/S0049-3848(15)50439-8. Epub 2015 Feb 9. PMID: 25903532.

Marí-Alexandre J, Sánchez-Izquierdo D, Gilabert-Estellés J, Barceló-Molina M, Braza-Boïls A, Sandoval J. miRNAs Regulation and Its Role as Biomarkers in Endometriosis. *Int J Mol Sci*. 2016 Jan 13;17(1):93. doi: 10.3390/ijms17010093. PMID: 26771608; PMCID: PMC4730335.

Martin JD Jr, Hauck AE. Endometriosis in the male. *Am Surg*. 1985 Jul;51(7):426-30. PMID: 4014886.

Matsuura K, Ohtake H, Katabuchi H, Okamura H. Coelomic metaplasia theory of endometriosis: evidence from in vivo studies and an in vitro experimental model. *Gynecol Obstet Invest*. 1999;47 Suppl 1:18-20; discussion 20-2. doi: 10.1159/000052855. PMID: 10087424.

Matsuzaki S, Canis M, Pouly JL, Déchelotte PJ, Mage G. Analysis of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 messenger ribonucleic acid expression in deep endometriosis and eutopic endometrium using laser capture microdissection. *Fertil Steril*. 2006 Feb;85(2):308-13. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.08.017. PMID: 16595205.

- Matsuzaki S, Canis M, Pouly JL, Botchorishvili R, Déchelotte PJ, Mage G. Differential expression of genes in eutopic and ectopic endometrium from patients with ovarian endometriosis. *Fertil Steril*. 2006 Sep;(3):548-53. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.02.093. Epub 2006 Jul 3. PMID: 16815388.
- McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Smith SK. Immunolocalization of the apoptosis regulating proteins Bcl-2 and Bax in human endometrium and isolated peritoneal fluid macrophages in endometriosis. *Hum Reprod*. 1997 Jan;12(1):146-52. doi: 10.1093/humrep/12.1.146. PMID: 9043920.
- Merchenthaler I. Estrogens. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Elsevier. 2018 Jan; 176–83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64639-1>.
- Munro SK, Farquhar CM, Mitchell MD, Ponnampalam AP. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*. 2010 May;16(5):297-310. doi: 10.1093/molehr/gaq010. Epub 2010 Feb 5. PMID: 20139117.
- Mustonen MV, Poutanen MH, Kellokumpu S, de Launoit Y, Isomaa VV, Vihko RK, Vihko PT. Mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 mRNA is predominantly expressed in hepatocytes and in surface epithelial cells of the gastrointestinal and urinary tracts. *J Mol Endocrinol*. 1998 Feb;20(1):67-74. doi: 10.1677/jme.0.0200067. PMID: 9513083.
- Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Sep;45(3 Suppl):S116-24. doi: 10.1067/mjd.2001.117432. PMID: 11511861.
- Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril*. 1997 Oct;68(4):585-96. doi: 10.1016/s0015-0282(97)00191-x. PMID: 9341595.
- Ohlsson Teague EM, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson SA, Print CG, Hull LM. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol*. 2009 Feb;23(2):265-75. doi: 10.1210/me.2008-0387. Epub 2008 Dec 12. PMID: 19074548; PMCID: PMC5419313.
- Crick FH. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol*. 1958;12:138-63. PMID: 13580867.
- Laudanski P, Charkiewicz R, Kuzmicki M, Szamatowicz J, Charkiewicz A, Niklinski J. MicroRNAs expression profiling of eutopic proliferative endometrium in women with ovarian endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013 Aug 15;11:78. doi: 10.1186/1477-7827-11-78. Erratum in: *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13:50. PMID: 23945042; PMCID: PMC3766175.
- Patel BG, Rudnicki M, Yu J, Shu Y, Taylor RN. Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017 Jun;96(6):623-632. doi: 10.1111/aogs.13156. PMID: 28423456.
- Qi, QM, Guo SW, Liu XS. Estrogen Biosynthesis and Its Regulation in Endometriosis. *Reprod Dev Med* 2017;1:55-61. <https://doi.org/10.4103/2096-2924.210698>.

- Rei C, Williams T, Feloney M. Endometriosis in a Man as a Rare Source of Abdominal Pain: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Obstet Gynecol*. 2018 Jan 31;2018:2083121. doi: 10.1155/2018/2083121. PMID: 29670782; PMCID: PMC5833878.
- Reis FM, Petraglia F, Taylor RN. Endometriosis: hormone regulation and clinical consequences of chemotaxis and apoptosis. *Hum Reprod Update*. 2013 Jul-Aug;19(4):406-18. doi: 10.1093/humupd/dmt010.
- Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997 May;67(5):817-21. doi: 10.1016/s0015-0282(97)81391-x. PMID: 9130884.
- Rizner TL. Estrogen metabolism and action in endometriosis. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Aug 13;307(1-2):8-18. doi: 10.1016/j.mce.2009.03.022. Epub 2009 Apr 8. PMID: 19524121.
- Saha R, Pettersson HJ, Svedberg P, Olovsson M, Bergqvist A, Marions L, Tornvall P, Kuja-Halkola R. Heritability of endometriosis. *Fertil Steril*. 2015 Oct;104(4):947-952. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.06.035. Epub 2015 Jul 22. PMID: 26209831.
- Sampson JA. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol*. 1927 Mar;3(2):93-110.43. PMID: 19969738; PMCID: PMC1931779.
- Santamaria X, Taylor H. MicroRNA and gynecological reproductive diseases. *Fertil Steril*. 2014 Jun;101(6):1545-51. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.044. PMID: 24882618.
- Sasson IE, Taylor HS. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Apr;1127:106-15. doi: 10.1196/annals.1434.014. PMID: 18443337; PMCID: PMC3107843.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8. doi: 10.1038/nprot.2008.73. PMID: 18546601.
- Shigeshi N, Kvaskoff M, Kirtley S, Feng Q, Fang H, Knight JC, Missmer SA, Rahmioglu N, Zondervan KT, Becker CM. The association between endometriosis and autoimmune diseases: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2019 Jul 1;25(4):486-503. doi: 10.1093/humupd/dmz014. PMID: 31260048; PMCID: PMC6601386.
- Smuc T, Rizner TL. Expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases and other estrogen-metabolizing enzymes in different cancer cell lines. *Chem Biol Interact*. 2009 Mar 16;178(1-3):228-33. doi: 10.1016/j.cbi.2008.10.038. Epub 2008 Nov 5. PMID: 19022235.
- Smuc T, Pucelj MR, Sinkovec J, Husen B, Thole H, Lanisnik Rizner T. Expression analysis of the genes involved in estradiol and progesterone action in human ovarian endometriosis. *Gynecol Endocrinol*. 2007 Feb;23(2):105-11. doi: 10.1080/09513590601152219. PMID: 17454161.
- Taylor HS, Kotlyar AM, Flores VA. Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges and novel innovations. *Lancet*. 2021 Feb 27;397(10276):839-852. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00389-5. PMID: 33640070.

Teague EM, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update*. 2010 Mar-Apr;16(2):142-65. doi: 10.1093/humupd/dmp034. Epub 2009 Sep 22. PMID: 19773286.

“Tissue Expression of HSD17B2 - Summary - The Human Protein Atlas.” n.d. Accessed July 12, 2021. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000086696-HSD17B2/tissue>.

Tseng L, Gurdip E. Effect of estrone and progesterone on the nuclear uptake of estradiol by slices of human endometrium. *Endocrinology*. 1973 Jul;93(1):245-8. doi: 10.1210/endo-93-1-245. PMID: 4712255.

Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004 Apr;18(2):177-200. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2004.01.007. PMID: 15157637.

Zampetaki A, Mayr M. Analytical challenges and technical limitations in assessing circulating miRNAs. *Thromb Haemost*. 2012 Oct;108(4):592-8. doi: 10.1160/TH12-02-0097. Epub 2012 May 25. PMID: 22627831.

Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S, Johns A, Meng L, Putman M, Carr B, Bulun SE. Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Dec;83(12):4474-80. doi: 10.1210/jcem.83.12.5301. PMID: 9851796.

Zondervan KT, Becker CM, Koga K, Missmer SA, Taylor RN, Viganò P. Endometriosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Jul 19;4(1):9. doi: 10.1038/s41572-018-0008-5. PMID: 30026507.