

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Patologia

Camila Pereira Almeida

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-
MESÊNQUIMA E SUAS MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS (PTMs) EM
LESÕES ENDOMETRIÓTICAS**

Belo Horizonte 2023

Camila Pereira Almeida

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-
MESÊNQUIMA E SUAS MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS (PTMs) EM
LESÕES ENDOMETRIÓTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Patologia – área de concentração em Patologia Investigativa.

Orientadora: Helen Lima Del Puerto

Coorientadores: Enio Ferreira, Marcella Nunes de Melo Braga e Fernando Marcos dos Reis

Belo Horizonte 2023

043

Almeida, Camila Pereira.

Análise da expressão de marcadores da transição epitélio mesênquima e suas modificações pós-traducionais (PTMs) em lesões endometrióticas [manuscrito] / Camila Pereira Almeida. – 2023.

136 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Helen Lima Del Puerto. Coorientadores: Enio Ferreira, Marcella Nunes de Melo Braga e Fernando Marcos dos Reis.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Endometriose. 3. Transição Epitelial-Mesenquimal. 4. Imuno-Histoquímica. 5. Espectrometria de Massas. 6. Proteoma. 7. Caderinas. 8. beta Catenina. I. Puerto, Helen Lima Del. II. Ferreira, Enio. III. Braga, Marcella Nunes de Melo. IV. Reis, Fernando Marcos dos. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. VI. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

"ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA E SUAS MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS (PTMS) EM LESÕES ENDOMETRIÓTICAS"

CAMILA PEREIRA ALMEIDA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de **Pós-Graduação em Patologia**, como requisito para obtenção do grau de **Doutor em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 04 de agosto de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Marina Diniz, ICB/UFMG

Prof. Dra. Márcia Cristina França Ferreira, Faculdade de Medicina-UFMG

Prof. Dr. Fabio Cesar Sousa Nogueira, UFRJ

Dr. Diego Carlos dos Reis, The Institute of Cancer Research, Inglaterra

Dra. Marcella Nunes de Melo Braga, ICB/UFMG – COORIENTADORA

Prof. Dr. Enio Ferreira, ICB/UFMG – COORIENTADOR

Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis, Faculdade de Medicina - UFMG - COORIENTADOR

Profa. Helen Lima Del Puerto, ICB/UFMG – ORIENTADORA

Belo Horizonte, 04 de agosto de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Helen Lima Del Puerto, Membro de comissão**, em 13/08/2023, às 15:55, 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 **Enio Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 14/08/2023, às 14:14, 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 **Marina Goncalves Diniz, Professora do Magistério Superior**, em 14/08/2023, às 15:29, 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 **Fernando Marcos dos Reis, Professor do Magistério Superior**, em 14/08/2023, às 17:19, 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 **Diego Carlos dos Reis, Usuário Externo**, em 15/08/2023, às 08:51, 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 **Marcella Nunes de Melo Braga, Usuário Externo**, em 15/08/2023, às 11:35, 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 **Marcia Cristina Franca Ferreira, Professora do Magistério Superior**, em 21/08/2023, às 10:46, 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 **Fábio César Sousa Nogueira, Usuário Externo**, em 21/08/2023, às 11:48, 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_acesso_externo=0, informando o código verificador **2541469** e o código CRC **7ADF1AES**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO Nº 468 DE CAMILA PEREIRA ALMEIDA

Realizou-se, no dia 04 de agosto de 2023, às 9 horas, formato remoto, a defesa de Tese, intitulada **"ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA E SUAS MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS (PTMs) EM LESÕES ENDOMETRIÓTICAS"**, apresentada por **Camila Pereira Almeida**, número de registro **2019695477**, graduada no curso de Biomedicina, e como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Dra. Marina Diniz**, ICB/UFMG; **Prof. Dra. Márcia Cristina França Ferreira**, Faculdade de Medicina-UFMG; **Prof. Dr. Fabio Cesar Sousa Nogueira**, UFRJ; **Dr. Diego Carlos dos Reis**, The Institute of Cancer Research, Inglaterra; **Profa. Dra. Marcella Nunes de Melo Braga**, ICB/UFMG – **COORIENTADORA**; **Prof. Dr. Enio Ferreira**, ICB/UFMG – **COORIENTADOR**; **Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis**, Faculdade de Medicina/UFMG – **COORIENTADOR**; **Profa. Helen Lima Del Puerto**, ICB/UFMG – **ORIENTADORA**.

A Comissão considerou a Tese:

APROVADO

REPROVADO

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 04 de agosto de 2023.

*** De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Doutor só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Tese, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Doutorado.**



Documento assinado eletronicamente por **Helen Lima Del Puerto, Membro de comissão**, em 13/08/2023, às 15:54, 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 **Enio Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 14/08/2023, às 14:13, 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 **Marina Gonçalves Diniz, Professora do Magistério Superior**, em 14/08/2023, às 15:29, 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 **Fernando Marcos dos Reis, Professor do Magistério Superior**, em 14/08/2023, às 17:19, 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 **Diego Carlos dos Reis, Usuário Externo**, em 15/08/2023, às 08:50, 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 **Marcella Nunes de Melo Braga, Usuário Externo**, em 15/08/2023, às 11:35, 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 **Marcia Cristina Franca Ferreira, Professora do Magistério Superior**, em 21/08/2023, às 10:46, 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 **Fábio César Sousa Nogueira, Usuário Externo**, em 21/08/2023, às 11:48, 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_acesso_externo=0, informando o código verificador **2541468** e o código CRC **9AC51B38**.



Este trabalho foi realizado no Laboratório do Comportamento Celular do Departamento de Patologia Geral – Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais, e no Protein Research Group do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - University of Southern Denmark, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

AGRADECIMENTOS

“A colheita celebrada pela comunidade unida é a alegria de Oxó si”. Agradeço à Orixá pela sustentação, pela clareza e equilíbrio, pelo ponto de luz no escuro, pelo afago na dor. À minha ancestralidade, por todos os sacrifícios que me permitiram seguir um caminho diferente e realizar sonhos que eles (principalmente elas) não puderam.

À minha mãe Rose e meu pai Klinger, pelo amor e apoio incondicional, mesmo quando isso significou que eu estivesse longe fisicamente. Vocês me permitiram a liberdade de viver quem eu quisesse ser e sempre ter pra onde voltar, não existe presente maior que esse. À minha irmã Alice, pela amizade e confiança. Amo vocês absolutamente, nenhuma das minhas conquistas seria possível ou faria sentido se não fossem vocês. Às minhas avós e tias, que me ensinaram o real significado de força. À toda minha família, pela compreensão na minha ausência e a alegria na minha presença.

Aos amigos que permaneceram, que se foram e que surgiram nos últimos anos, por construírem comigo a pessoa que sou hoje.

À Helen, pelas portas sempre abertas, por acolher as minhas ideias, pela confiança no meu trabalho e respeito mútuo. Ao longo destes 7 anos você me ensinou muito mais do que tenho espaço para descrever, obrigada pela oportunidade de crescer. Ao Enio, pelas trocas sempre sinceras, pelo senso crítico apurado (as vezes até demais) e pelos pés no chão. À Marcella, por me apresentar um novo mundo de possibilidades e o carinho ao me guiar por ele. Aos três, obrigada sobretudo por serem meus parceiros – poucas pessoas na pós graduação têm esse privilégio.

Aos grandessíssimos amigos que fiz no LCC, Bárbara, Bruna, Felipe, Emerson e Thaís. Vocês permitiram que eu sobrevivesse à pós. Obrigada pelo apoio em todos os momentos da minha trajetória, por ouvirem minhas lamúrias, pelos conselhos e por sempre envolver comida em qualquer ocasião, amo vocês. A todos os alunos que tive a oportunidade de conviver nos últimos 7 anos no laboratório, por me permitirem aprender e também ensinar.

To Martin, for the opportunity of a lifetime and remembering me what it looks like to be truly excited and passionate about science. To Arek, for the patience to teach me something from scratch. To all the PR group, for making me feel so welcome and kindly sharing your knowledge

with someone that barely knew what proteomics meant. To all the amazing friends that supported me as a family in Denmark: Lucrezia, Belèn, Sophie, Maria, Samuel, Amanda, Silvio, Pelayo, Arthur, Peter, Joel, Jessica, Sofie, Ana, Lucas, Vladimir.

Ao professor Fernando, pela experiência e sabedoria compartilhadas. Ao professor Antônio Marcos e todo o corpo médico, de enfermagem e técnico que possibilitaram que este trabalho pudesse ser realizado. A todos os colaboradores que de alguma forma contribuíram para a execução do nosso projeto. A todas as pacientes, gratidão pela contribuição inestimável ao meu trabalho.

Ao Instituto de Ciências Biológicas e à UFMG, que foram minha segunda casa por mais de 10 anos. A todos os professores que me ensinaram a profissional eu quero (ou não) ser. Às agências federais e estaduais de fomento, pelo apoio financeiro que possibilitou este trabalho.

A mim mesma, por não ter desistido.

Muito obrigada, Axé!

RESUMO

A Transição Epitélio-Mesênquima (TEM) é um potencial mecanismo envolvido no desenvolvimento da endometriose devido a alterações em moléculas de adesão celular e vias que podem levar a uma maior capacidade de migração e invasão do endométrio ectópico. Modificações pós-traducionais (PTMs, do inglês), como glicosilação e fosforilação, são cruciais na regulação da atividade de marcadores da TEM, e até o momento não há dados sobre o perfil dessas modificações em lesões endometrióticas. Portanto, com o objetivo de avaliar a expressão e as modificações (PTM) das proteínas envolvidas na TEM, o presente estudo foi dividido em uma análise retrospectiva das variações dos marcadores de TEM em lesões endometrióticas de diferentes estruturas pélvicas por meio da avaliação da expressão gênica por RT-qPCR e proteica por imunohistoquímica; assim como uma análise baseada em espectrometria de massa do proteoma total e perfil de PTMs na endometriose peritoneal. No primeiro estudo, observaram-se dois padrões histológicos nas lesões endometrióticas examinadas: um padrão glandular bem diferenciado e um padrão glandular indiferenciado, ambos coexistindo nas mesmas amostras. Não houve diferença na expressão de RNAm de E-caderina entre as amostras controles e as de lesões endometrióticas. No entanto, houve uma regulação negativa da expressão gênica de N-caderina e Snail, e uma regulação positiva da expressão gênica de ZEB1 nas lesões endometrióticas. A análise imunohistoquímica revelou uma maior frequência de baixa expressão de E-caderina, associada a uma maior frequência de alta expressão de N-caderina e β -catenina membranar na endometriose. Todos os grupos apresentaram baixa expressão de β -catenina nuclear. Vimentina foi positiva em todas as amostras, com uma expressão discretamente aumentada nas lesões endometrióticas. Esses dados corroboram a hipótese de que as células epiteliais endometrióticas demonstram um fenótipo parcial de TEM, expressando marcadores tanto epiteliais quanto mesenquimais. No segundo estudo, nossos resultados não apresentaram diferença significativa no perfil geral de expressão dos grupos analisados. No entanto, as lesões endometrióticas apresentaram 276 regulações significativas no proteoma total, 2240 no fosfoproteoma e 481 no N-glicoproteoma contendo ácido siálico (sialoma) quando comparadas ao endométrio eutópico de pacientes com endometriose. Uma análise mais aprofundada dessas regulações revelou enriquecimento de processos biológicos no *Gene Ontology* (GO) e vias no KEGG para contração do citoesqueleto de actina, regulação positiva da adesão célula-substrato, interação matriz extracelular (ECM)-receptor e adesão focal no proteoma total e fosfoproteoma. E-caderina, p120-catenina e Twist 2 apresentaram sítios fosforilados com regulação negativa nas lesões endometrióticas que podem levar a um aumento da adesão celular. Proteínas ligantes de actina, como actinina, filamina A e vinculina, apresentaram sítios fosforilados com regulação positiva que poderiam perturbar o citoesqueleto celular e diminuir a adesão celular. Esse equilíbrio entre o aumento e a diminuição da adesão celular nas lesões endometrióticas fornece importantes percepções sobre as mudanças celulares necessárias para o desenvolvimento e estabelecimento da lesão endometriótica. Em conclusão, os achados do presente estudo destacam a importância da fosforilação e da N-glicosilação contendo ácido siálico na preservação da integridade das junções aderentes na endometriose e oferecem novos caminhos para pesquisas futuras sobre a influência de modificações pós-traducionais na regulação da transição epitélio-mesênquima para o estabelecimento da endometriose.

PALAVRAS-CHAVE: Endometriose, transição epitelial-mesênquimal, TEM, caderinas, beta catenina, p120-catenina, twist 2, imunohistoquímica, espectrometria de massa, proteoma, PTMoma

ABSTRACT

The Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) is a potential mechanism in the development of endometriosis due to alterations in cell adhesion molecules and pathways that can lead to enhanced migratory capacity and invasive ability of ectopic endometrium. Post-translational modifications (PTMs) like glycosylation and phosphorylation are crucial in regulating many EMT/cell adhesion markers, and up to date there is no data about the profile of these modifications in endometriosis. Therefore, this study was divided into one retrospective evaluation of variations of EMT markers in endometriotic lesions from different pelvic structures through genic and protein expression analysis; and a prospective mass spectrometry-based analysis of the total proteome and PTMome profile of EMT proteins in peritoneal endometriosis. For the first study, we observed two histologic patterns in the examined endometriotic lesions, a well-differentiated glandular pattern, and an undifferentiated glandular pattern, both coexisting in the same samples. The mRNA expression revealed no difference in E-cadherin expression between control and lesions samples. However, there was downregulation of N-cadherin and Snail mRNA expression, and an upregulation of ZEB1 gene expression in endometriotic lesions. Immunohistochemical analysis revealed a higher frequency of low E-cadherin expression, associated with a higher frequency of high N-cadherin and membrane β -catenin expression in endometriosis. All groups had low expression of nuclear β -catenin. Vimentin was positive in all samples, with a discreet increased expression in endometriotic lesions. This data corroborates the hypothesis that endometriotic epithelial cells demonstrate a partial EMT phenotype, expressing both epithelial and mesenchymal markers. In the second study, our results showed no major differences in the overall expression profile of the analyzed groups, but the endometriotic lesions presented 276 significant regulations in the total proteome, 2240 in the phosphoproteome and 481 in the sialic acid (SA) N-glycoproteome when compared with the endometrium of endometriosis patients. A deeper analysis of those regulations revealed Gene Ontology (GO) biological processes and KEGG pathways enriched for actin cytoskeleton contraction, positive regulation of cell-substrate adhesion, ECM-receptor interaction and focal adhesion in the total proteome and phosphoproteome. E-cadherin, p120-catenin and Twist 2 presented downregulated phosphosites in endometriotic lesions that can potentially lead to increased cell adhesion. Actin-binding proteins like actinin, filamin A and vinculin presented upregulated phosphosites that could disrupt the cell cytoskeleton and decrease cell adhesion. That balance between increased and decreased cell adhesion in endometriotic lesions provide us important insights about the cellular changes needed for the development and progression of endometriosis. In conclusion our findings highlight the significance of phosphorylation and SA N-glycosylation in preserving the integrity of adherens junctions in endometriosis, and offer new insights for future research into the influence of post-translational modifications on the regulation of epithelial-mesenchymal transition for the establishment of endometriosis.

KEYWORDS: Endometriosis, epithelial-mesenchymal transition, cadherins, beta catenin, p120-catenin, twist 2, immunohistochemistry, mass spectrometry, proteome, PTMome

LISTA DE TABELAS

Tabelas tese

Tabela 1: Sequência dos *Primers* utilizados na PCR em tempo real38

Tabela 2: Lista de anticorpos, com os respectivos fabricantes, clones, diluição, tempo de incubação, método de recuperação antigênica e anticorpo secundário.39

Tabelas primeiro artigo

Table 1: Primers sequence for real time PCR.....49

Table 2: IHC protocol for E-cadherin, N-cadherin, Vimentin and β -catenin antibodies.....49

Table 3: Patients clinical features.51

Tabelas segundo artigo

Table 1: Patients clinical features72

Table 2: Phosphorylation of cell adhesion-related proteins in endometriotic lesions79

Table 3: Sialic acid glycosylation of cell adhesion-related proteins in endometriotic lesions 83

LISTA DE FIGURAS

Figuras tese

Figura 1: Resumo das interações entre as principais moléculas e fatores de transcrição envolvidos na TEM..	28
---	----

Figuras primeiro artigo

Figure 1: Histological features of control endometrium and endometriotic lesions	64
Figure 2: Relative expression of EMT target genes	65
Figure 3: Immunostaining of EMT targets	66
Figure 4: Immunostaining frequency of EMT main targets	67

Figuras segundo artigo

Figure 1: GO biological processes and KEGG enriched pathways from the upregulated total proteome fraction in endometriotic lesions	109
Figure 2: GO biological processes and KEGG enriched pathways from the upregulated phosphoproteome fraction in endometriotic lesions	110
Figure 3: Cell adhesion-related proteins and their post-translational modifications (PTMs) identified in endometriotic lesions	111
Supplemental Figure 1: Upset plot of identified and quantified proteins in the total proteome, phosphoproteome and SA glycoproteome of the analyzed samples.	112
Supplemental Figure 2: Overall total proteome and PTMome profile of analyzed samples	113

Supplemental Figure 3: Significantly regulated proteins, phosphopeptides and SA glycopeptides in analyzed groups	114
Supplemental Figure 4: Overlap of significantly regulated proteins, phosphopeptides and SA glycopeptides in analyzed groups	115
Supplemental Figure 5: Enriched GO biological processes from the downregulated phosphoproteome fraction (A) and the downregulated SA glycoproteome fraction (B) in endometriotic lesions.	116
Supplemental Figure 6: Predicted kinases activity between Control Endometrium (CE), Endometriosis Endometrium (EE), Endometriosis Lesion (EL)	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL: Microlitro

AKT: Proteína kinase B

ASRM: Do inglês “*American Society for Reproductive Medicine*”

CAM's: Do inglês “*Cell adhesion molecules*”

cDNA: DNA complementar

CKII: Do inglês “*casein kinase 2*”

COX-2: Ciclo-oxigenase-2

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Ct: Do inglês “*Cycle Threshold*”

CTBP: do inglês “*C-terminal-binding protein*”

DAB: 3'3-diaminobenzidina

DNase: Desoxirribonuclease

DIE: do inglês “*deep infiltrating endometriosis*”

E2: Estradiol

ECM: Do inglês “*extracellular matrix*”

EGF: Fator de crescimento epidérmico

EGFR: Receptor de fator de crescimento epidérmico

EMT: Do inglês “*epithelial-mesenchymal transition*”

FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais

FGF: Fator de crescimento fibroblástico

FSH: Hormônio folículo estimulante

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GDF: Fator de crescimento e diferenciação;

GSK3β: Do inglês “*Glycogen synthase kinase-3 beta*”

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas

GO: Do inglês “*gene ontology*”

hCG: Gonadotrofina coriônica humana

HE: Hematoxilina-eosina

HGF: Fator de crescimento do hepatócito

HIF1 α : do inglês “*factor hypoxia-inducible factor 1 α* ”

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IGF: Fatores de crescimento tipo insulina

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

KEGG: Do inglês “*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*”

kg: Quilograma

LC: do inglês “*liquid chromatography*”

LCC: Laboratório do Comportamento Celular

LH: Hormônio luteinizante

MEC: Matriz extracelular

miRNA: Micro Ácido Ribonucléico

mL: Mililitro

MMP: do inglês “*matrix metalloproteinases*”

mRNA: Ácido Ribonucléico mensageiro

MS: do inglês “*mass spectrometry*”

N: arginina

°C: Grau Celsius

O-GlcNac: do inglês “*O-linked N-acetylglucosamine*”

OMS: Organização Mundial de Saúde

pb: Pares de base

PBS: Tampão fosfato-salino

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PGE2: prostaglandina E2

pH: Potencial hidrogeniônico

PI3K: do inglês “*Phosphatidylinositol-3-kinase*”

PRC2: do inglês “*Polycomb Repressive Complex 2*”

PTMs: do inglês “*post-translational modifications*”

qRT-PCR: Transcrição reversa com reação em cadeia da Polimerase quantitativa

RE: Receptores de estradiol

ReTIAR: do inglês “*repeated tissue injury and repair*”

RNA: Ácido ribonucleico

RNase: Enzima ribonuclease

RP: Receptores de progesterona

Rpm: Rotações por minuto

RT: Transcrição reversa

SDC: desoxicolato de sódio

SE: do inglês “*superficial endometriosis*”

TCF/LEF1: do inglês “*T cell factors e lymphocyte enhancer binding factor 1*”

TEM: transição epitélio mesenquima

TGF: Fator de crescimento transformador

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

U: Unidades

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. CLASSIFICAÇÃO E ASPÉCTOS CLÍNICOS DA ENDOMETRIOSE.....	22
2.2. ETIOPATOGENESE E FISIOPATOLOGIA DA ENDOMETRIOSE	24
2.3. TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA	26
2.4. TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA NA ENDOMETRIOSE	31
2.5. PTMS NA ENDOMETRIOSE	32
3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	34
4. OBJETIVOS	34
4.1. OBJETIVO GERAL	34
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
5. MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	35
5.2. AMOSTRAS DE ENDOMÉTRIO EUTÓPICO E LESÕES ENDOMETRIÓTICAS.....	36
5.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA	37
5.4. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E TRANSCRIÇÃO REVERSA	37
5.5. OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS.....	37
5.6. IMUNOHISTOQUÍMICA.....	38
5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA ESTUDO RETROSPECTIVO	39
5.8. EXTRAÇÃO E DIGESTÃO DE PROTEÍNAS.....	40
5.9. MARCAÇÃO COM <i>TANDEM MASS TAGGING</i> (TMT)	41
5.10. ENRIQUECIMENTO DE PEPTÍDEOS FOSFORILADOS E N- GLICOSILADOS CONTENDO ÁCIDO SIÁLICO	42
5.11. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ESPECTROMETRIA DE MASSA (MS) EM TANDEM	42
5.12. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	43
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1. PRIMEIRO ARTIGO	44
6.2. SEGUNDO ARTIGO	68
7. FATORES LIMITANTES DO PROJETO/ESTUDO	120
8. CONCLUSÕES	121

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
10. ANEXOS	130
10.1. ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	130

1. INTRODUÇÃO

Endometriose é uma desordem comum que afeta em torno de 15% das mulheres em idade reprodutiva, e está associada a dor pélvica severa (de maneira cíclica através de todo o ciclo menstrual e durante e/ou após relações sexuais) assim como infertilidade (ZONDERVAN et al., 2018). Apesar de ter sido exaustivamente estudada no último século, muitos aspectos da fisiopatologia da endometriose ainda são obscuros, e progressos práticos quanto a predição, prevenção e tratamento da doença permanecem de certa forma inconclusivos.

É necessário que uma série de eventos ocorram para a formação das lesões endometrióticas. Dentre eles estão a adesão e penetração da superfície peritoneal pelas células endometrióticas, proliferação e invasão local, angiogênese, neurogênese e inflamação, todos esses fatores sendo passíveis de promover dor. O microambiente tecidual controla esses fenômenos e sua regulação é influenciada por uma variedade de hormônios e componentes celulares. Até então, o maior enfoque foi dado ao componente hormonal, sendo os hormônios ovarianos extensivamente estudados, tornando-se a base das terapias e do manejo atual de pacientes com endometriose (ZONDERVAN et al., 2018). Outros mecanismos, porém, têm ganhado destaque nos últimos anos, como a transição epitélio-mesênquima (TEM).

TEM é um processo biológico no qual células epiteliais polarizadas, através de mudanças consecutivas, adquirem fenótipo de células mesenquimais. A TEM possui papel importante em uma série de processos biológicos, como a implantação e embriogênese, patogênese de tumores malignos, além de estar associada a cicatrização de feridas, regeneração tecidual e fibrose (KALLURI; WEINBERG, 2009). O mecanismo molecular da TEM em células epiteliais envolve a perda funcional de moléculas epiteliais, como E-caderina, β -catenina e queratina, e aumento da expressão de marcadores mesenquimais como N-caderina, vimentina, actina de músculo liso entre outros (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014). Células de origens distintas, como epitélio peritoneal, células endoteliais e células epiteliais do endométrio, são passíveis de sofrer transição epitélio-mesênquima, levando ao desenvolvimento de endometriose (YANG; YANG, 2017). Diversos trabalhos já demonstram a atuação de fatores de transcrição importantes para a regulação da TEM no agravamento da endometriose: ZEB1, TWIST1 e SNAIL foram associados à supressão da expressão de E-caderina, liberação de β -catenina e maior expressão de vimentina, promovendo TEM e uma ativação anormal da endometriose

(BARANOV; MALYSHEVA; YARMOLINSKAYA, 2018; LIN et al., 2018; XIONG et al., 2016).

No entanto, KONRAD *et. al.* (2020) demonstraram que as mudanças nesses marcadores de TEM são tênues entre o endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose. Adicionalmente, poucas alterações são observadas nos marcadores de contato célula-célula, sem alterações no fenótipo epitelial. Isso sugere que o processo de TEM ocorre parcialmente, e não seja um pré-requisito para o descolamento de células endometriais do endométrio eutópico de pacientes com endometriose, em comparação com o endométrio eutópico de pacientes sem endometriose e, portanto, não seria um processo crítico para a patogênese da endometriose. Em contraste, a maioria das mudanças na expressão de marcadores relacionados à TEM foram encontrados no endométrio ectópico, especialmente em lesões de endometriose ovariana, peritoneal e infiltrativa profunda, em comparação com o endométrio eutópico.

A regulação da TEM ocorre desde a nível pré-transcricional (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014) quanto pós-traducional, já que as principais proteínas envolvidas no processo possuem algum tipo de modificação pós-traducional (*post-translational modifications* – PTMs). Grande parte dos marcadores da TEM são proteínas fosforiladas e/ou glicosiladas, sendo assim, esta ação combinada entre diferentes PTMs é um mecanismo essencial em vários processos, tais como a modulação da atividade de receptores, enzimas e fatores de transcrição. De fato, já foi observada alteração no perfil de fosforilação de proteínas de vias de sinalização da adesão celular na TEM, como actina e β -catenina, no endométrio de mulheres com endometriose (XU et al., 2015). Porém, até o presente momento não há na literatura estudos que investiguem a participação das PTMs na regulação de marcadores da TEM em lesões endometrióticas. Devido a relevância clínica da endometriose e recursos terapêuticos escassos ou controversos, tornam-se necessários estudos que aprofundem o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das lesões, e o presente trabalho tem como objetivo investigar o papel da fosforilação e da N-glicosilação contendo ácido siálico em marcadores importantes da transição epitélio-mesênquima na endometriose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CLASSIFICAÇÃO E ASPÉCTOS CLÍNICOS DA ENDOMETRIOSE

A endometriose é uma desordem reprodutiva que corresponde a uma inflamação crônica estrógeno-dependente associada ao crescimento de tecido semelhante ao endométrio em outros locais que não a cavidade uterina. Esses locais incluem normalmente a cavidade pélvica como ovários, ligamentos, peritônio, bexiga e segmentos do intestino grosso. Ela afeta aproximadamente 10% a 15% das mulheres em idade reprodutiva, e até 30% a 50% de pacientes que sofrem de dores pélvicas crônicas e/ou infertilidade (SIGNORILE et al., 2022; WANG; NICHOLAS; SHIH, 2020; ZONDERVAN; BECKER; MISSMER, 2020). A doença pode ser dividida em três diferentes entidades: peritoneal superficial (SE), endometriose ovariana (endometrioma ou “cistos de chocolate”) e endometriose infiltrativa profunda (DIE). Essa categorização se baseia nas possíveis diferenças de patogênese, distribuição anatômica e variações morfológicas (como a distribuição de células epiteliais glandulares e estromais). Porém, principalmente para lesões superficiais e profundas, essa categorização ainda não é tão direta, há pouca concordância entre a cor, formato e profundidade do endométrio ectópico (ZONDERVAN et al., 2018). Com o surgimento de novos dados moleculares e métodos mais padronizados de coleta, processamento e análise das lesões, espera-se que seja desenvolvida uma subcategorização mais eficiente e funcional para a endometriose análoga às que existem para diferentes neoplasias e doenças autoimunes, levando a um manejo cada vez mais especializado da doença.

A Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM, do inglês) estratifica a endometriose em 4 estádios (I, II, III e IV) baseados em um sistema de pontos que leva em consideração a localização, extensão e profundidade das lesões em relação às estruturas pélvicas (CANIS et al., 1997). Órgãos como útero, trompas uterinas e ovários, além de estruturas que incluem a fossa ovárica, ligamentos uterossacro, septo retovaginal, escavações retouterina e vesicouterina, são normalmente afetadas. O tamanho das lesões pode variar de pontos de poucos milímetros até estruturas nodulares com alguns centímetros e cistos ovarianos (endometrioma) do tamanho de uma laranja (ALIMI et al., 2018; ZONDERVAN et al., 2018). O estágio I (mínima, 1-5 pontos) normalmente se refere a poucos pontos de lesões superficiais ou aderências. No estágio II (leve, 6-15 pontos) pode haver poucas lesões profundas, em combinação ou não com lesões superficiais e aderências finas. O estágio III (moderada, 16-40

pontos) normalmente inclui um endometrioma isolado ou associado a lesões superficiais ou profundas e/ou aderências densas. Já o estágio IV (severa, >40 pontos) é caracterizado por todos os achados acima, além de endometriomas bilaterais e/ou adesões densas que podem levar a obliteração parcial ou total da pélvis (CANIS et al., 1997; ZONDERVAN et al., 2018). O fato de a classificação da ASRM associar a predominância de lesões superficiais aos quadros mínimos e leves (estádios I e II) pode levar a uma associação errônea entre a SE e quadros clínicos mais brandos. Porém é importante ressaltar que essa classificação é limitada à visão laparoscópica da cavidade pélvica e já foi demonstrado que pacientes com diagnóstico cirúrgico apenas de lesões superficiais apresentam frequência aumentada de infertilidade primária, dismenorreia moderada a severa e dispareunia profunda (REIS et al., 2020). Assim, mesmo descrita como o fenótipo mais agressivo da doença, a DIE não deve ser considerada a única responsável pelos piores quadros de dor ou infertilidade, sendo que algumas pacientes classificadas como estágio IV podem ser inclusive assintomáticas (ZONDERVAN; BECKER; MISSMER, 2020).

Lesões superficiais e profundas são estabelecidas e mantidas através de mecanismos de interação celular que promovem adesão celular e proliferação, esteroidogênese local e sistêmica, desregulação localizada da resposta imune e inflamatória, vascularização e inervação. Mas alguns dos mecanismos de invasão característicos da endometriose, como a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) e ativinas, estão intensificados na DIE, além da expressão aumentada de diferentes fatores neuroangiogênicos (NGF, VEGF e moléculas de adesão intercelular). Fatores imunológicos (macrófagos, células NK e linfócitos peritoneais) também se encontram criticamente alterados na DIE, e seu comportamento agressivo pode estar associado ainda à apoptose bastante reduzida (ROLLA, 2019; ZONDERVAN; BECKER; MISSMER, 2020). Alguns estudos apontam ainda para mudanças genéticas e epigenéticas específicas ocorrendo para cada fenótipo da endometriose, levando a regulações distintas dos fatores de transcrição e moléculas envolvidas no processo de estabelecimento e desenvolvimento das lesões (BARANOV; MALYSHEVA; YARMOLINSKAYA, 2018; KONINCKX et al., 2019).

Por não possuir patogênese, diagnóstico e terapias completamente definidos, a endometriose ainda é considerada uma doença bastante obscura. Devido a essa lacuna nas informações disponíveis sobre a doença, ainda há uma grande defasagem no diagnóstico e tratamento, com

um intervalo bastante longo e desproporcional entre o início dos sintomas (normalmente durante a adolescência) e um diagnóstico conclusivo: de 8 a 12 anos (SIGNORILE et al., 2022). Apesar do desenvolvimento crescente de antagonistas ou agonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), inibidores de aromatase, moduladores seletivos de receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP), e drogas anti-inflamatórias, algumas pacientes ainda são refratárias ao tratamento farmacológico. O surgimento de novos fármacos direcionados a alvos específicos e individualizados nas pacientes (antioxidantes, inibidores de quinases, modificadores epigenéticos, microRNAs (miRNAs)) levantam novas possibilidades de tratamentos personalizados que sejam mais eficazes, reforçando a necessidade do estudo de novos alvos farmacológicos (WANG; NICHOLE; SHIH, 2020).

2.2. ETIOPATOGENESE E FISIOPATOLOGIA DA ENDOMETRIOSE

Existem muitas teorias e hipóteses sobre a origem das células endometriais ectópicas, sendo as principais delas a menstruação retrógrada, metaplasia do celoma, distribuição por vias angiolinfáticas e sangramento uterino neonatal. A hipótese principal e de maior aceitação, pelo menos para a endometriose peritoneal, é a da menstruação retrógrada, proposta inicialmente por Sampson em 1927. Ela postula que fragmentos de tecido endometrial menstrual contendo glândulas e estroma endometriais viáveis são capazes de alcançar a cavidade peritoneal através da expulsão retrógrada pelas tubas uterinas, onde irão aderir e invadir o mesotélio subjacente (SAMPSON, 1927). Entretanto, não há uma única teoria capaz de explicar todas as diferentes manifestações clínicas e traços patológicos da endometriose, especialmente em apresentações mais raras como nos pulmões ou em homens (WANG; NICHOLE; SHIH, 2020). A menstruação retrógrada, por exemplo, demonstrou ser um processo fisiológico extremamente comum, acometendo mais de 90% das mulheres (HALME et al., 1984), o que levantou novos questionamentos devido à prevalência relativamente baixa da endometriose na população, demonstrando que, além da presença de células endometriais na cavidade pélvica, outros mecanismos como desbalanço na sinalização de hormônios esteróides no tecido endometrial, comprometimento da resposta imune e mecanismos epigenéticos, são extremamente importantes para o desenvolvimento da doença (GIUDICE; KAO, 2004).

O endométrio eutópico é considerado a origem da maioria das lesões endometrióticas e uma infinidade de estudos tem buscado encontrar diferenças na expressão gênica e modificações epigenéticas entre o endométrio eutópico e ectópico, em genes específicos ou sua regulação por

miRNAs. Alguns trabalhos já demonstraram que a maioria das lesões de endometriose profunda apresentavam mutações somáticas, incluindo em genes já associados ao processo carcinogênico, como *KRAS*, *PIK3CA*, *ARID1A*, e *PPP2R1A* (ANGLESIO et al., 2017; WANG; NICHOLAS; SHIH, 2020), mas por não apresentarem acúmulo de mutações elas não seriam o bastante para originar uma lesão neoplásica.

Somente a presença dessas células endometriais “semeadas” na cavidade peritoneal (ou transformadas após metaplasia) não é o suficiente para dar origem a doença. É necessário que ocorra a adesão dessas células na superfície peritoneal (no caso da menstruação retrógrada), escape do sistema imune e apoptose, e ativação da proliferação celular, angiogênese/neurogênese e invasão – sendo que todos esses fenômenos são passíveis de causar sintomas de dor. Tudo isso é regulado pelo microambiente tecidual, orquestrado por fatores inflamatórios, alterações no sistema imune, desbalanços hormonais, alterações genéticas e epigenéticas, assim como fatores ambientais (CHAPRON et al., 2019; ZONDERVAN; BECKER; MISSMER, 2020).

Dentre os diferentes fatores envolvidos na patogênese da endometriose, o papel dos hormônios ovarianos foi estudado de forma mais expressiva, tornando essa abordagem a base dos tratamentos farmacológicos e manejo das pacientes com endometriose. Já se sabe que o endométrio de pacientes com endometriose apresenta uma menor atividade de vias de sinalização ativadas por RP e uma maior atividade de vias ativadas por RE, sendo essa variação ainda mais pronunciada quando lesões endometrióticas são comparadas com o endométrio eutópico. Isso é bastante importante, considerando que terapias antiestrogênicas e com uso de progesterona são a base dos tratamentos de endometriose, e que algumas pacientes são refratárias à essas medicações, levantando a hipótese de uma possível resistência a progesterona na endometriose (AL-SABBAGH; LAM; BROSENS, 2012; PATEL et al., 2017; WANG; NICHOLAS; SHIH, 2020; ZONDERVAN et al., 2018). A maior atividade dos receptores de estradiol resulta em um aumento na transcrição de genes anti-apoptóticos, maior produção de fatores de crescimento, aumento da proliferação celular e maior expressão de marcadores da TEM associados ao perfil mesenquimal (HAN et al., 2015; PELLEGRINI et al., 2012). Uma menor atividade de vias ativadas pela progesterona também promove a inflamação na endometriose, já que uma menor atividade dos RP reduz seus efeitos antagonistas ao perfil pró inflamatório das vias dos RE (WANG; NICHOLAS; SHIH, 2020; ZONDERVAN et al., 2018).

Há inúmeras evidências do papel da inflamação e do desbalanço do sistema imune na endometriose, sendo a inflamação – e fibrose subsequente – responsáveis pela maioria dos sintomas clínicos, incluindo dor pélvica, problemas intestinais e urinários, e infertilidade. Uma explicação para a inflamação crônica observada na doença é a presença por si só do endométrio ectópico, que seria reconhecido como um corpo estranho, levando à ativação de uma resposta inflamatória para eliminá-lo. A ineficácia dessa resposta em eliminar todos os focos de lesão seria responsável pelos sintomas e agravamento da doença (WANG; NICHOLAS; SHIH, 2020; ZONDERVAN et al., 2018). Diversos mediadores como a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), interleucina 1 β (IL-1 β), 6 (IL-6) e 8 (IL-8), fator de necrose tumoral α (TNF- α), prostaglandina E2 (PGE2) e estradiol (E2) estão elevados nas lesões endometrióticas em comparação ao endométrio eutópico, trabalhando de forma sinérgica para sustentar e agravar a inflamação (GRUND et al., 2008; JUHASZ-BÖSS et al., 2011; NOBLE et al., 1997; TSENG et al., 1996; WU et al., 2005). Ativação de células T e B, macrófagos e disfunções na atividade de células NK também são descritas, levando a produção de diversas citocinas e quimiocinas que mantêm o perfil pró-inflamatório da endometriose e, conseqüentemente, ao seu agravamento (ZONDERVAN et al., 2018).

Juntamente com a maior ativação das vias de sinalização dos receptores de estradiol, a inflamação crônica e o contexto de reparo tecidual permanente que caracteriza o microambiente das lesões endometrióticas levam a uma modificação do perfil de expressão das moléculas de adesão no local, abrindo margem para a investigação de mais um fenômeno que pode contribuir para o agravamento da endometriose: a transição epitélio-mesênquima.

2.3. TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA

A transição epitélio-mesênquima foi inicialmente proposta por Gary Greenburg e Elizabeth Hay ao observarem essas alterações fenotípicas em células tanto embrionárias quanto já bem diferenciadas, levando-os a cunhar o termo para retratar a plasticidade e dinamicidade do fenômeno (GREENBURG; HAY, 1982). Ela é desencadeada em resposta a fatores de sinalização que estimulam a expressão de fatores de transcrição, miRNAs e reguladores epigenéticos e pós-traducionais, que por sua vez irão promover alterações genotípicas e fenotípicas que conferem às células epiteliais características de células mesenquimais, favorecendo processos migratórios, invasivos, além de resistência a apoptose (FORONI et al., 2012; NIETO et al., 2016).

Células epiteliais e mesenquimais apresentam diferenças em sua expressão gênica e proteica, o que impacta em suas respectivas morfologias e funções. Células epiteliais funcionam como barreiras de permeabilidade em órgãos e tecidos, geralmente estruturadas em uma única camada de células dispostas de maneira uniforme. Apresentam polaridade basal-apical, além de diferentes complexos de adesão e comunicação celular, como junções aderentes e comunicantes, desmossomas e zônulas oclusivas, garantindo a integridade e rigidez do epitélio como estrutura (HUANG; GUILFORD; THIERY, 2012). Já as células mesenquimais formam os tecidos conjuntivos e não apresentam processos de organização ou adesão celular tão estruturados quanto as células epiteliais, apresentando morfologia fusiforme e ausência de polaridade basal-apical (SHOOK; KELLER, 2003). Estas diferenças estruturais entre células epiteliais e mesenquimais impactam na capacidade migratória de cada tipo celular: por estarem fortemente aderidas umas às outras, células epiteliais se movimentam em blocos ou camadas, enquanto as células mesenquimais têm um potencial mais dinâmico de migração, podendo migrar de maneira mais individualizada (LEE et al., 2006; MAEDA; JOHNSON; WHEELLOCK, 2005).

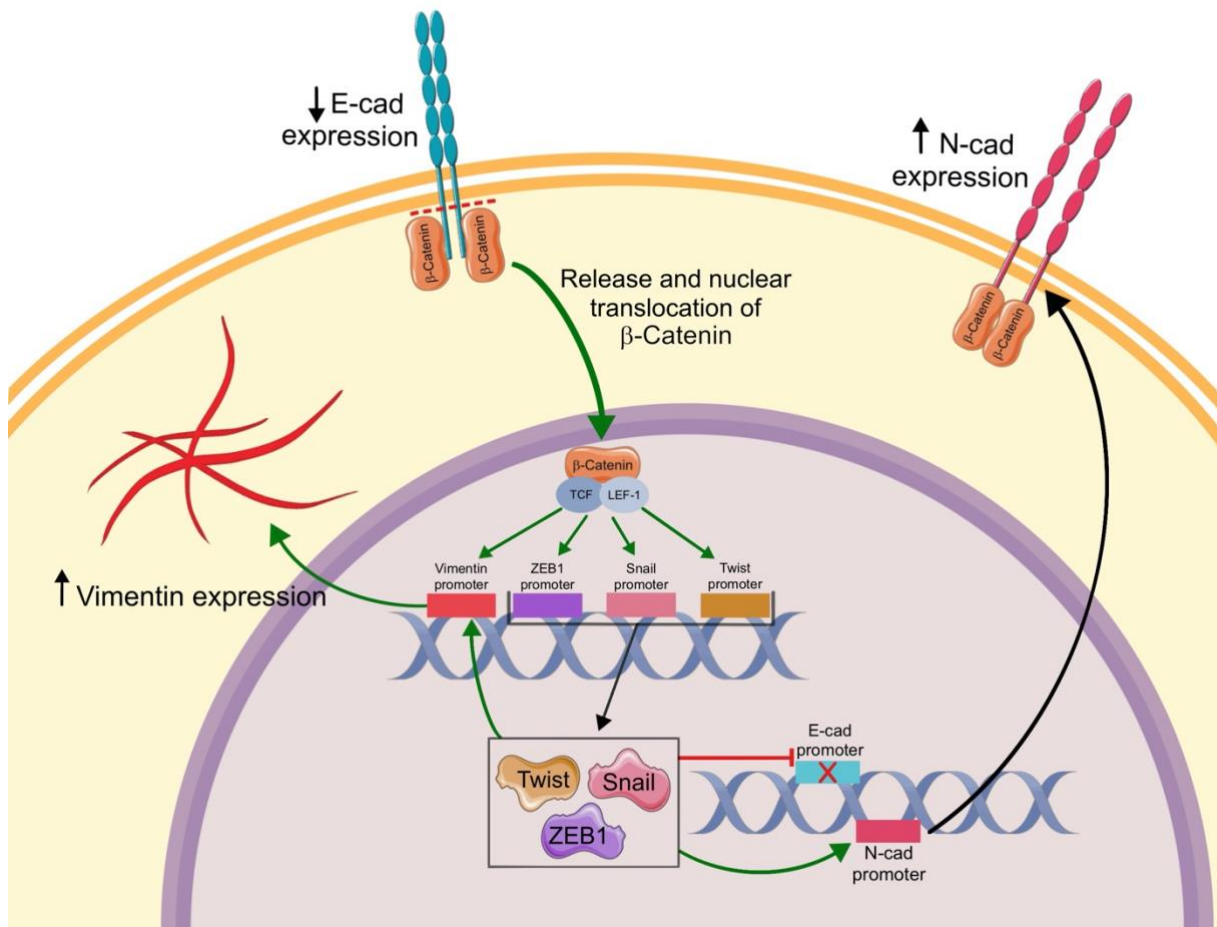
Uma das principais alterações necessárias para a ocorrência da TEM é a alteração do padrão de adesão celular, permitindo que alterações morfológicas e de capacidade migratória ocorram. Essas alterações são observadas principalmente nas moléculas de adesão celular (CAMs), glicoproteínas transmembranares com domínio extracelular cálcio-dependente, como as caderinas, integrinas, selectinas, mucinas e imunoglobulinas, que fazem a ligação da célula com a matriz extracelular (MEC). Essa alteração da adesão celular é caracterizada principalmente pela redução da expressão de marcadores epiteliais, como a E-caderina, β -catenina e citoqueratina, associado ao aumento da expressão de marcadores mesenquimais, como a N-caderina, vimentina e fibronectina (KALLURI; WEINBERG, 2009).

Devido ao aspecto transiente da TEM, diversos autores têm observado a ocorrência de uma TEM “parcial”, onde as células que passam por este processo não adquirem características completas de células mesenquimais, gerando células com fenótipo híbrido entre o status epitelial e mesenquimal (JORDAN; JOHNSON; ABELL, 2011; NIETO et al., 2016; YU et al., 2013). A TEM, seja total ou parcial, é associada a fenômenos tanto fisiológicos (desenvolvimento embrionário e cicatrização de feridas), quanto patológicos (processos fibróticos e neoplásicos). A aquisição de um perfil mesenquimal é um dos fenômenos que

favorece a migração e invasão celular que ocorrem por exemplo nas neoplasias, pois a redução da expressão de E-caderina favorece a invasão estromal podendo ser considerada um marcador de malignidade em diferentes neoplasias (BERX; VAN ROY, 2001). Já o aumento da expressão de N-caderina, além de também facilitar a invasão ao promover a adesão a células endoteliais, é responsável ainda pela ativação de vias anti-apoptóticas, como a Akt/PKB, e inativação de vias pró-apoptóticas associadas ao BCL-2 (LI; SATYAMOORTHY; HERLYN, 2001).

A regulação da expressão de moléculas relacionadas a TEM ocorre tanto a nível pré-transcricional quanto pós-transcricional. A regulação pré-transcricional é realizada pelos fatores de transcrição das famílias *Zinc-finger E-box binding* (ZEB1 e ZEB2), Snail (Snail, Slug, Smuc) e *Basic helix-loop-helix* (Twist1 e Twist2), que atuam promovendo o perfil mesenquimal. A ativação destes fatores de transcrição ocorre nos primeiros estágios da TEM, e eles possuem diferentes perfis de expressão, a depender do tipo celular ou tecido envolvido, ou ainda das vias de sinalização que iniciam a transição. Além disso, é comum que eles controlem a expressão uns dos outros e regulem os genes-alvo de forma conjunta (Fig. 1). Diversas vias de sinalização cooperam na ativação e progressão da TEM, muitas delas através da ativação dos fatores de transcrição, sendo que as famílias de proteínas TGF- β e WNT e vias ativadas pelo estradiol estão diretamente associadas à repressão do perfil epitelial (HAO; BAKER; DIJKE, 2019; LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014; XIONG et al., 2019).

Figura 1: Resumo das interações entre as principais moléculas e fatores de transcrição envolvidos na TEM. A redução na expressão de E-caderina (E-cad) leva a liberação de β -catenina no citoplasma, que pode ser translocada para o núcleo e atuar como ativador da transcrição de vimentina, ZEB1, Snail e Twist. A ativação destes fatores de transcrição da TEM bloqueiam a expressão de E-cad e induzem a expressão de N-caderina (N-cad), alterando o perfil de adesão e motilidade celular (juntamente com a vimentina). LEF-1: do inglês “*lymphocyte enhancer binding factor 1*”; TCF: do inglês “*T cell factor*”. Ilustração da autora (Camila Pereira Almeida).



Snail está associado não só à repressão de genes associados ao fenótipo epitelial como também à ativação de genes que contribuem para um perfil mesenquimal e atua se ligando às sequências *E-box* do DNA através da porção carboxi-terminal de seus domínios *zinc-finger* (PEINADO; OLMEDA; CANO, 2007; WU et al., 2009). Ao se ligar ao promotor do gene da E-caderina, SNAIL1 recruta o *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2), um complexo proteico que coordena metilação e acetilação de histonas específicas em “domínios bivalentes” do promotor, levando ao silenciamento reversível da E-caderina (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014). Além do TGF- β , E2 e fatores de crescimento, a β -catenina parece ter um papel importante na ativação de Snail. A β -catenina livre no citoplasma é translocada para o núcleo, induzindo a transcrição de Snail e criando assim um mecanismo de feedback positivo da ativação da TEM, através da redução da expressão de E-caderina e consequente liberação de mais β -catenina (WANG et al., 2018; XIONG et al., 2019).

Assim como Snail, a expressão de Twist regula negativamente os genes de perfil epitelial e positivamente genes associados ao perfil mesenquimal, e em células neoplásicas Twist1 silencia E-caderina e induz a expressão de N-caderina independente da participação de Snail (HAO; BAKER; DIJKE, 2019; XU; LAMOUILLE; DERYNCK, 2009). Twist1 atua através da regulação de mecanismos de migração celular e reorganização tecidual, envolvendo a perda funcional de E-caderina acompanhada de uma expressão excessiva de MMP, favorecendo as condições para a migração (BARANOV; MALYSHEVA; YARMOLINSKAYA, 2018). Sua principal via de ativação ocorre em condições de hipóxia, pela atuação do Fator Induzível por Hipóxia 1 α (HIF1 α), mas também mediado pela β -catenina em condições de estresse mecânico, levando à monometilação do H4K20, um marcador de histona associado à repressão de promotores da E-caderina e ativação de promotores da N-caderina (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014).

Os fatores de transcrição ZEB, como Snail e Twist, também se ligam ao domínio *E-box* e atuam como repressores da transcrição de genes epiteliais que regulam moléculas juncionais e a polaridade celular, e ativadores de genes de marcadores mesenquimais (por exemplo, a N-caderina e vimentina) que definem o fenótipo da TEM. Além de ser induzido pela ação do TGF- β , via de sinalização canônica WNT/ β -catenina e fatores de crescimento que ativam vias RAS-MAPK, a expressão de ZEB normalmente se segue à ativação de Snail (com auxílio de Twist1), e seus mecanismos de repressão transcricional estão normalmente associados ao recrutamento de um co-repressor da proteína C-terminal de ligação (CTBP) (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014; QIN et al., 2019; SÁNCHEZ-TILLÓ et al., 2010; WU et al., 2020).

A TEM também pode ser regulada a nível pós-traducional, já que as principais proteínas envolvidas no processo possuem algum tipo de modificação pós-traducional (*post-translational modifications* – PTMs). As PTMs podem modular proteínas pela adição e/ou remoção de grupos químicos ou biomoléculas, como carboidratos, fosfatos e grupos acetila, sendo importantes reguladores das propriedades físico-químicas das proteínas, modulando suas funções e interações com outras moléculas, sendo que várias doenças são causadas por anormalidades relacionadas às PTMs (PRABAKARAN et al., 2012). Grande parte dos marcadores da TEM são proteínas glicosiladas e/ou fosforiladas, incluindo E- e N-caderina, β -catenina, vimentina, ZEB1, Twist 1 e 2 e Snail, e essas PTMs funcionam de maneira combinatória na modulação dos efeitos celulares. As junções aderentes, formadas pelo

complexo caderina-cateninas é amplamente regulado pela fosforilação das proteínas envolvidas. O domínio de ligação da E-caderina é altamente regulado por meio da fosforilação dos resíduos Ser840, Ser846 e Ser847 pela caseína quinase 2 (CKII) e pela glicogênio sintase quinase-3 beta (GSK3 β), permitindo ligação de alta afinidade com a β -catenina, promovendo adesão celular e estabilidade de superfície da E-caderina. (LICKERT et al., 2000; MCEWEN et al., 2014; STAPPERT; KEMLER, 1994). Outro exemplo é a β -catenina, cuja fosforilação regula sua expressão no citoplasma (impedindo ou ativando sua degradação), mas a translocação dessa proteína para o núcleo é dependente de glicosilação (SAYAT et al., 2008). Isso demonstra a importância das PTMs para a ativação dos fatores de transcrição da TEM pela via Wnt/ β -catenina. Adicionalmente, entre os fatores de transcrição, não só a localização celular e degradação de Snail são dependentes de fosforilação, como sua capacidade de ligação ao promotor da E-caderina também é regulada por essa PTM (SERRANO-GOMEZ; MAZIVEYI; ALAHARI, 2016). Além disso, o aumento da O-GlcNAc glicosilação de Snail em condições hiperglicêmicas leva à sua estabilização e consequentemente uma maior supressão de E-caderina e ativação da TEM (PARK et al., 2010).

2.4. TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA NA ENDOMETRIOSE

As primeiras evidências da ocorrência de TEM na endometriose foram observadas a partir de ensaios *in vitro* de células epiteliais de cultura primária de lesões peritoneais, onde as células negativas para E-caderina apresentavam perfil invasor, e demonstrando ainda uma diminuição da expressão de E-caderina em biópsias de lesões endometrióticas, em comparação ao endométrio eutópico (GAETJE et al., 1997). Desde então, diversos trabalhos têm se debruçado sobre esse tema, sugerindo o envolvimento da TEM na patogênese da endometriose.

Como descrito anteriormente, devido às condições de inflamação crônica e injúria/reparo tecidual constante, diversas moléculas envolvidas na ativação da TEM estão presentes no contexto da endometriose, como TGF- β , TNF- α , E2 e vias de sinalização WNT/ β -catenina. Porém ainda existem lacunas sobre os possíveis mecanismos de regulação dos principais marcadores tanto da transição epitélio-mesênquima quanto mesênquima-epitelial (como E-caderina e N-caderina, vimentina, β -catenina e os fatores de transcrição) na endometriose.

A maioria dos trabalhos aponta para uma redução de marcadores epiteliais como a E-caderina e β -catenina nas lesões endometrióticas, sendo esse fenótipo associado à uma maior capacidade

de migração e invasão (GAETJE et al., 1997; GRUND et al., 2008; KONRAD et al., 2020; MATSUZAKI; DARCHA, 2012; PONCELET et al., 2002). Porém, mesmo apresentando uma expressão reduzida em comparação ao endométrio eutópico, lesões profundas e lesões superficiais pretas têm expressão de E-caderina mais elevada dentre as 3 manifestações típicas da endometriose (KONRAD et al., 2020; MATSUZAKI; DARCHA, 2012). Considerando outras moléculas importantes para a manutenção do perfil epitelial, como as claudinas (presentes nas junções célula-célula), existem relatos da diminuição da expressão das claudinas 1 e 4, mas sem alterações na expressão de 2, 5, 7 e 11 (GAETJE et al., 2008; HOERSCHER et al., 2020; HORNÉ et al., 2019). Assim, a redução desses marcadores representa uma perda parcial do fenótipo epitelial pelas lesões endometrióticas, indicando que a TEM pode não ser necessária para a disseminação das células endometriais, e que a aquisição de características mesenquimais ocorre após a implantação dessas células em locais ectópicos, mas com manutenção do perfil epitelial (KONRAD et al., 2020).

Quanto aos marcadores mesenquimais, a maioria dos estudos mostra um aumento de expressão nas lesões – não só de N-caderina e vimentina, como também de Snail, ZEB1 e Twist (BARTLEY et al., 2014; CAI et al., 2018; FURUYA et al., 2017; KONRAD et al., 2019; LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014; MATSUZAKI; DARCHA, 2012; NISOLLE; CASANAS-ROUX; DONNEZ, 1995; XIONG et al., 2019). A maior expressão dos fatores de transcrição, suprimindo a expressão de E-caderina, e induzindo a expressão de N-caderina e vimentina, induzem alterações nos padrões de adesão celular e do citoesqueleto que possibilitam uma maior motilidade das células epiteliais de lesões endometrióticas, permitindo que lesões profundas alcancem até mesmo a camada mucosa de porções do intestino, por exemplo. Já foi sugerido que existam variações no perfil de fosforilação da β -catenina no endométrio de pacientes com endometriose, e que as lesões expressam uma isoforma específica de vimentina, mas o número de trabalhos que abordam PTMs na endometriose ainda é bastante limitado (FERRERO, 2019; SOŁKIEWICZ et al., 2021; STEPHENS et al., 2010; XU et al., 2015).

2.5. PTMs NA ENDOMETRIOSE

O estudo do fosfoproteoma e do glicoproteoma tem se mostrado uma abordagem promissora no campo da endometriose, proporcionando novas perspectivas sobre os mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento da doença. As modificações pós-traducionais,

como a fosforilação e a glicosilação de proteínas, têm um impacto significativo na regulação das vias de sinalização celulares, na adesão e na interação celular, na resposta inflamatória e imune (COHEN, 2001; CUMMINGS, 2019), portanto alterações nos padrões de PTMs podem impactar diretamente o desenvolvimento da endometriose.

Trabalhos que utilizam ferramentas proteômicas no estudo da endometriose têm focado nas diferenças do endométrio eutópico de pacientes com e sem endometriose, ou na avaliação de marcadores sorológicos e no fluido peritoneal (BAUGH et al., 2022; FERRERO et al., 2007; HWANG et al., 2014; MANOUSOPOULOU et al., 2019; POLINESS et al., 2004; TEN HAVE et al., 2007). Nessa perspectiva, foram propostas regulações na adesão focal e na via de sinalização PI3K/AKT no endométrio de pacientes com endometriose, além do uso das proteínas matriz oligomérica da cartilagem (COMP) e proteína IG-H3 induzida pelo fator de crescimento transformador β (TGFBI) como possíveis marcadores diagnósticos no fluido peritoneal (JANŠA et al., 2021; MÉAR et al., 2022). Avaliações comparativas entre o endométrio eutópico e lesões endometrióticas são escassas, e um trabalho buscando marcadores diagnósticos demonstrou enriquecimento de proteínas de adesão focal/matriz extracelular e vias de sinalização da progesterona em pacientes com endometriose (IRUNGU et al., 2019). Porém, estes estudos não buscaram avaliar alterações nos padrões de PTMs.

A análise do fosfoproteoma na endometriose foi realizada exclusivamente no endométrio eutópico de pacientes com e sem a doença. Nessa análise, foram observadas alterações nas vias de adesão focal (XU et al., 2015). No entanto, é importante mencionar que essa avaliação foi conduzida de maneira ampla, sem discussão sobre quais fosforilações específicas em proteínas associadas a essa via foram afetadas. Quanto ao perfil do glicoproteoma na endometriose, a literatura atualmente descreve apenas que os níveis de sialilação e galactosilação/agalactosilação de IgG no soro de pacientes podem ser utilizados como parâmetros para identificar pacientes com alto risco de desenvolver endometriose (SOLKIEWICZ et al., 2021). Portanto, mesmo oferecendo um amplo campo de investigação sobre a etiopatogênese da endometriose pouco ainda se foi explorado sobre o papel destas PTMs no desenvolvimento da doença, especialmente levando-se em conta possíveis alterações em proteínas envolvidas na TEM.

Em conjunto, a literatura atual demonstra a expressão concomitante de marcadores epiteliais e mesenquimais na endometriose, corroborando a teoria de um fenótipo de TEM parcial

(KONRAD et al., 2020), mas ainda deixam em aberto em que momento essas modificações ocorrem nas lesões, como os diferentes fenótipos da endometriose sofrem essa transição, como as proteínas da TEM podem ter seus padrões de PTMs alterados, e como essas modificações podem influenciar no estabelecimento das lesões endometrióticas.

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Apesar da existência de diversos estudos apontando a importância da TEM na patogênese da endometriose, ainda há diversas lacunas sobre como este processo atua. Além disso, a maioria dos trabalhos presente na literatura buscaram por marcadores diagnósticos no soro ou no endométrio eutópico de pacientes com endometriose, sem avaliação direta nas lesões endometrióticas. Sendo assim, pouco se foi discutido sobre as possíveis alterações nos padrões de fosforilação e N-glicosilação contendo ácido siálico das proteínas e em especial dos marcadores da TEM nas lesões endometrióticas. Sabe-se que a aquisição de um perfil mesenquimal leva a uma maior capacidade de invasão e sobrevivência das células, logo a hipótese do presente estudo é que os principais marcadores da TEM são regulados por modificações pós-traducionais de forma distinta no endométrio eutópico e nas lesões endometrióticas, induzindo um fenótipo e comportamento celular associado a um perfil mais invasivo.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a expressão gênica, a abundância proteica e os padrões de fosforilação e N-glicosilação contendo ácido siálico de moléculas relacionadas à TEM em amostras de endométrio eutópico e de diferentes tipos de lesões endometrióticas humanas.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever e avaliar possíveis variações morfológicas do componente epitelial de lesões endometrióticas humanas superficiais e profundas provenientes de diferentes estruturas pélvicas;

- Determinar a expressão gênica de E-caderina, N-caderina, ZEB1 e SNAIL em amostras de lesões endometrióticas humanas superficiais e profundas provenientes de diferentes estruturas pélvicas;
- Determinar a imunolocalização de E-caderina, N-caderina, vimentina, β -catenina, ZEB1, Snail, Twist no componente epitelial de lesões endometrióticas humanas superficiais e profundas provenientes de diferentes estruturas pélvicas;
- Avaliar quantitativamente o perfil proteômico das lesões endometrióticas superficiais e profundas provenientes do ligamento uterossacro a partir da análise do fosfoproteoma e sialoma destas lesões, e mapear as proteínas envolvidas na TEM;
- Correlacionar os achados de expressão gênica, imunohistoquímica e proteômica das lesões endometrióticas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo retrospectivo é uma extensão do trabalho registrado na Plataforma Brasil sob o número CAAE: 60378816.1.0000.5149 e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFMG (Projeto original aprovado em 03/11/2016; Emenda 1 aprovada em 08/11/2019). O estudo proteômico está registrado na Plataforma Brasil sob o número CAAE: 52182921.4.1001.5102 e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação De Ensino Superior Do Vale Do Sapucaí.

Todas as participantes receberam informações detalhadas sobre o projeto e só foram incluídas após ler, compreender e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo COEP-UFMG (Anexo 1). Foram incluídas pacientes preferencialmente sem uso de contraceptivos hormonais, em fase proliferativa do ciclo menstrual, com indicação de vídeo laparoscopia para tratamento de endometriose ou pacientes submetidas a laqueadura tubária.

5.2. AMOSTRAS DE ENDOMÉTRIO EUTÓPICO E LESÕES ENDOMETRIÓTICAS

As amostras de ambos os estudos foram obtidas no Hospital das Clínicas “Samuel Libânio” (HCSL) ou Hospital e Maternidade Santa Paula (HMSP) em Pouso Alegre, provenientes de fragmentos a fresco de biópsias realizadas durante cirurgias de laqueadura tubária, investigação de infertilidade ou para retirada das lesões.

No estudo retrospectivo, o processamento histológico/inclusão em parafina e a extração de RNA total do material coletado nas cirurgias foram realizados pelos nossos colaboradores, sendo recebidos 23 blocos de parafina para a realização da coloração de hematoxilina e eosina (HE) e imunohistoquímica (IHQ), e 23 amostras de RNA total para a realização da transcrição reversa e PCR em tempo real. Foram recebidas 4 amostras de endométrio controle de pacientes submetidas à laqueadura tubária sem diagnóstico de endometriose pélvica à laparoscopia. As amostras de pacientes com endometriose foram obtidas de pacientes submetidas à laparoscopia para investigação de infertilidade ou tratamento de endometriose, sendo 6 amostras de endométrio, e 13 amostras de lesões endometrióticas: 5 lesões de peritônio, 6 lesões de reto sigmoides, 1 lesão de ligamento uterossacro e 1 lesão de ureter.

As amostras de tecido de endométrio humano, amostras de lesões endometrióticas e amostras saudáveis de peritônio utilizadas no estudo proteômico foram coletadas de outras nove mulheres submetidas a cirurgia laparoscópica nos centros cirúrgicos citados acima, entre novembro de 2021 e maio de 2022. Três pacientes submetidas a ligadura tubária sem endometriose pélvica diagnosticada por laparoscopia e sem condições subjacentes tiveram biópsias coletadas do endométrio e peritônio associado ao ligamento uterossacro para os grupos Endométrio Controle (CE) e Peritônio Controle (CP). Seis pacientes submetidas a cirurgia laparoscópica para investigar causas de infertilidade ou para tratamento de endometriose tiveram biópsias coletadas do endométrio e lesões endometrióticas do ligamento uterossacro para os grupos Endométrio Endometriose (EE) e Lesão Endometriose (EL). O diagnóstico foi baseado na visualização das lesões endometrióticas e em critérios histopatológicos, e o estágio da endometriose foi avaliado de acordo com a classificação revisada da Sociedade Americana de Fertilidade (CANIS et al., 1997). Todas as amostras foram coletadas durante a fase secretora do ciclo menstrual (quando aplicável), congeladas rapidamente em nitrogênio líquido após serem dissecadas em PBS a 4 °C e armazenadas em nitrogênio líquido até o processamento.

5.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA

Secções histológicas de 4 µm de espessura foram cortadas e coradas com hematoxilina e eosina, e analisadas por duplo observador. As amostras foram analisadas para a presença de endometriose a partir da identificação de elementos histológicos epiteliais e estromais compatíveis com o endométrio, com presença ou ausência de estroma e associados à sinais de hemorragia e fibrose. Após confirmação de endometriose, as lesões foram avaliadas morfológicamente com base nas variações no aspecto das estruturas endometriais ectópicas encontradas, segundo os seguintes padrões: glandular bem diferenciado, glandular indiferenciado, glandular misto e estromal (ABRAO et al., 2003).

5.4. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E TRANSCRIÇÃO REVERSA

No estudo retrospectivo, a expressão dos genes-alvo para TEM (E-caderina, N-caderina, ZEB1, Snail) foi avaliada por PCR em tempo real após a extração de RNA total das amostras.

Para a extração do RNA total as amostras foram homogeneizadas em 1000 µL de TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), utilizando-se o protocolo do fabricante sem modificações. Ao término do protocolo, o RNA total foi ressuspenso em 20 µL de água *diethylpyrocarbonate* (H₂O DEPC), livre de ribonuclease (RNase) e desoxirribonuclease (DNase) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para biologia molecular e quantificado no *NanoDrop Lite* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA).

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA), seguindo o protocolo do fabricante sem modificações.

5.5. OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS

Os *primers* utilizados foram desenhados entre exons com base na análise da sequência do RNAm descrito no GeneBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA) com auxílio do site da empresa Integrated DNA Technologies (Integrated DNA Technologies, Inc., Skokie, IL, USA) e tiveram sua homologia com o gene em questão avaliados por meio do Blastnt no NCBI (NCBI, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA).

Como gene de referência para controle interno utilizamos o gene GAPDH. As reações foram realizadas no aparelho QuantStudio™ 3 *Real-Time* PCR (*Thermo Fisher Scientific*, Wilmington, Delaware, USA) no Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados (Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG), utilizando-se o Kit SYBR *Green*® PCR *Master Mix Kit* (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram aplicadas em placas de 96 poços *MicroAmp*® *Optical 96-Well Reaction Plate* (*Applied Biosystems*, Waltham, Massachusetts, USA), em duplicata, no volume final de reação de 20 µL. A quantificação foi realizada pelo método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), depois de serem normalizadas pelo controle interno. A sequência dos primers e suas características estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos *Primers* utilizados na PCR em tempo real

Primers	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do fragmento	Número de acesso do GenBank
GAPDHForw	TGGGTGTGAACCATGAGAAG	125	NM_001289746.1
GAPDHRev	GAGTCCTTCCACGATACCAAAG		
E-CADForw	CCCTTCACAGCAGAACTAAC	108	NM_001317185.1
E-CADRev	CACCTCTAAGGCCATCTTTG		
N-CADForw	GGACCGAGAATCACCAAATG	94	NM_001308176.1
N-CADRev	CGTTCCTGTTCCACTCATAG		
SNAILForw	GCAGGACTCTAATCCAGAGTTTACC	127	NM_005985.4
SNAILRev	GACAGAGTCCCAGATGAGCATT		
ZEB1Forw	GGGAGGATGACAGAAAGGAA	100	NM_001323654.1
ZEB1Rev	GCATCTGACTCGCATTTCATC		

5.6. IMUNOHISTOQUÍMICA

No estudo retrospectivo, a imunohistoquímica foi realizada pela técnica de reação em peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário polimerizado (*Novolink Polymer Detection Sistem*; *Leica Biosystems*, Newcastle upon Tyne, UK). A recuperação antigênica foi feita em calor úmido (banho-maria a 98°C) com *Target Retrieval Solution Citrate* - pH 6,0 (*Dako Cytomation*, Glostrup, Denmark). Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas por dois tempos de 10 minutos em solução de H₂O₂ 3% em álcool metílico. Para bloqueio das proteínas endógenas as lâminas foram incubadas por 20 minutos em *Protein Block Serum-Free Ready to Use* (*Dako North America*; *Via Real Carpinteria*, CA, USA). Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo de incubação do anticorpo primário de 16 horas, e do cromógeno 3'3'-diaminobenzidina (*Liquid DAB+Substrate Chromogen system*; *Dako North America*, *Via Real Carpinteria*, CA, USA) de 3 minutos. Após

a incubação no DAB os cortes foram contracorados com 3 mergulhos em hematoxilina e lavados em água corrente por 5 minutos. Na Tabela 2 estão listadas as características dos anticorpos e da reação. Para controle negativo foi omitida a etapa do anticorpo primário, com sua substituição pelo diluente de anticorpo (*Antibody Diluent with Background Reducing Components*; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA).

Tabela 2: Lista de anticorpos, com os respectivos fabricantes, clones, diluição, tempo de incubação, método de recuperação antigênica e anticorpo secundário.

	Fabricante	Clone	Diluição	Tempo de incubação	Recuperação antigênica
E-Caderina	Invitrogen	4A2C7	1:50	16h	Citrato + calor úmido
N-Caderina	Dako	6G11	1:75	16h	Citrato + calor úmido
Vimentina	Santa Cruz	Vim3B4	1:500	16h	Citrato + calor úmido
β-catenina	Santa Cruz	sc-7963	1:200	16h	Citrato + calor úmido

A interpretação da marcação imunohistoquímica foi realizada em microscopia óptica convencional, em aumento de 600x (Olympus – BX41), e foi avaliada nas células epiteliais endometriais e endometrióticas. A marcação membranar/citoplasmática de E-caderina, a marcação membranar/citoplasmática de N-caderina e a marcação membranar/citoplasmática e nuclear de β -catenina foram classificadas segundo o percentual de células marcadas: 0 (ausência de marcação), 1 (<25%), 2 (25-50%), 3 (50-75%), 4 (>75%) (adaptado de PRASAD et al., 2009). Para Vimentina foram contadas 500 células (marcadas e não marcadas) por avaliador único, de forma aleatória utilizando-se o *plug-in* “grid” do *software* ImageJ (*National Institutes of Health*, NIH), e o resultado foi dado como percentual de células marcadas.

5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA ESTUDO RETROSPECTIVO

Para as análises citadas até aqui, os dados da expressão gênica foram normalizados utilizando-se o gene de referência GAPDH por meio do método Δ Ct (Ct do gene alvo – Ct do gene normalizador), e a expressão gênica relativa avaliada através do *fold change* com os dados de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A normalidade dos dados foi avaliada através do teste

de Shapiro-Wilk. Para relacionar as variáveis semi-quantitativas, devido ao número reduzido de amostras os casos foram segmentados em dois grandes grupos: abaixo de 50% de células marcadas e acima de 50% de células marcadas, e em seguida foram feitas as comparações com o teste Exato de Fisher. Para análise das variáveis quantitativas foi feita análise de média pelo *one-way* ANOVA com pós teste de múltiplas comparações de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis com pós teste de múltiplas comparações de Dunn. Possíveis correlações foram avaliadas pelo Teste de Spearman ou Pearson. O software utilizado foi o GraphPad Prism 9 e foram consideradas como significativos resultados cuja probabilidade de significância do teste foi de $p < 0,05$.

5.8. EXTRAÇÃO E DIGESTÃO DE PROTEÍNAS

Todos os reagentes foram adquiridos pela Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), a menos que indicado de outra forma.

No estudo proteômico, o endométrio (controle e endometriose), peritônio e lesões endometrióticas foram homogeneizados em Reagente TRI utilizando 1 mL para cada 50-100 mg de tecido, utilizando um homogeneizador de tecidos, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A fase aquosa superior incolor contendo RNA foi transferida para um tubo livre de RNA e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. A fase intermediária contendo DNA foi cuidadosamente descartada e a fase orgânica inferior vermelha (proteínas) foi transferida para um tubo Lobind (Eppendorf) e armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração das proteínas.

Para remover qualquer contaminação de DNA, foi adicionado 0,3 ml de etanol 100% frio por 1 ml de Reagente TRI à fase proteica, misturado e centrifugado a 2.000 g por 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi coletado em tubos Lobind (Eppendorf), e o pellet de DNA foi descartado. As proteínas do sobrenadante fenol-etanol foram precipitadas com 1,5 ml de 2-propanol por 1 ml de Reagente TRI, as amostras foram deixadas por pelo menos 10 minutos em temperatura ambiente (RT) e centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado, e os pellets de proteínas foram lavados 3 vezes com solução de cloreto de guanidina 0,3 M em etanol 95%, utilizando 2 ml por 1 ml de Reagente TRI. Durante cada lavagem, as amostras foram incubadas com a solução de lavagem por 20 minutos em temperatura ambiente (TA) e depois centrifugadas a 7.500 g por 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (KANG et al., 2021). Após a última lavagem, o sobrenadante foi removido e o pellet foi lavado com 2 ml de etanol 100%, vortexado,

incubado por 20 minutos em TA e centrifugado a 7.500 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi seco sob centrifugação a vácuo.

Os pellets foram ressuspensos em uma solução contendo 1% de SDS, 0,2% de desoxicolato de sódio (SDC), inibidor de protease (Cocktail de Inibidor de Protease cOmplete™, Mini, EDTA-free - Roche) e inibidor de fosfatase (PhosSTOP - Roche) em 100 mM de TEAB (pH 8,0). A amostra foi sonicada de 2 a 5 vezes por 20 segundos a 40% de amplitude em gelo e centrifugada a 3.200 g por 10 minutos a 4 °C para sedimentar o material insolubilizado. O sobrenadante com proteínas solubilizadas foi incubado com 10 mM de ditioneína (DTT) a 60 °C por 30 minutos. Após resfriamento para TA, as amostras foram incubadas com 25 mM de iodoacetamida por 30 minutos no escuro. Para remover completamente fenol, tiocianato de guanidina e SDS, a precipitação com clorofórmio/metanol foi realizada conforme descrito anteriormente com adaptações (WESSEL; FLÜGGE, 1984). Resumidamente, 100 µL de cada amostra foi misturada com metanol, clorofórmio e água destilada (4:1:3, v/v/v) e, em seguida, centrifugado a 14.000 g por 1 min a TA. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e 0,4 mL de metanol foi adicionado ao anel proteico turvo na fase intermediária/fase inferior do clorofórmio, seguido de vórtex e centrifugação a 20.000 g por 5 minutos a TA. O metanol foi removido o máximo possível e os pellets de proteínas foram secos sob centrifugação a vácuo. Os pellets foram dissolvidos em 100 µL de SDC a 0,2% em 50 mM de TEAB (pH 8,0) e incubados no sonicador por 5 minutos. Tripsina (Promega, Madison, WI, EUA) foi adicionada às amostras (1:50, p/p) e a solução foi incubada durante a noite a 37 °C. A remoção assistida por transferência de fase do SDC foi realizada conforme descrito por Erde e colaboradores (ERDE; LOO; LOO, 2014). As amostras foram ressuspensas com ácido fórmico (FA) a 2%, centrifugadas para remover possíveis resíduos de SDC e secas novamente para marcação com “*Tandem Mass Tagging*” (TMT).

5.9. MARCAÇÃO COM *Tandem Mass Tagging* (TMT)

A amostra foi ressuspensa em tampão HEPES a 100 mM (pH 8,5) para atingir uma concentração de proteínas de 2 µg/µL, e a quantificação foi confirmada usando o kit de ensaio de proteínas Qubit no Qubit® *Fluorometric Quantitation* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Um total de 50 µg de cada amostra foi marcado com o TMTpro™ 18-plex (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As 18 amostras, divididas em 4 grupos, foram marcadas da seguinte forma: i) Endométrio Controle (CE): 128N,

128C e 129N; ii) Peritônio Controle (CP): 126, 127N e 127C; iii) Endométrio Endometriose (EE): 131N, 131C, 132N, 134N, 134C e 135; e iv) Lesão Endometriose (EL): 129C, 130N, 130C, 132C, 133N e 133C. Após a marcação, os peptídeos foram misturados em proporções iguais para enriquecimento e análise simultânea de PTMs.

5.10. ENRIQUECIMENTO DE PEPTÍDEOS FOSFORILADOS E N-GLICOSILADOS CONTENDO ÁCIDO SIÁLICO

O enriquecimento de peptídeos fosforilados e/ou N-glicosilados contendo ácido siálico foi realizado a partir da mistura de peptídeos marcados com TMT, seguindo um protocolo previamente publicado (PALMISANO et al., 2012). A fração de peptídeos não modificados foi obtida a partir do *flow-through* do enriquecimento com TiO₂ e secado sob centrifugação a vácuo. Os peptídeos eluídos do TiO₂ foram ressuspensos em 50 mM de TEAB (pH 7,5-8,0) e tratados com PNGase F (New England BioLabs Inc., Massachusetts, EUA), para remoção de glicanos ligados à asparagina, e Sialidase A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) para remoção de ácido siálico, durante a noite a 37 °C para remover glicanos de ácido siálico ligados à asparagina (LARSEN et al., 2007). Após a desglicosilação, as frações de peptídeos fosfo/deglicosilados e não modificados foram acidificadas (pH 1,5-2,0) com ácido trifluoroacético (TFA) a 100% e dessalinizadas com uma mistura 1:1 das resinas de fase reversa PorosTM 50 R2 e R3 (Thermo Scientific, EUA) em uma coluna *stage tip*. Em seguida, as amostras foram submetidas à fracionamento usando fase reversa de alto pH (High-pH RP) para diminuir a complexidade, conforme publicado (BOLL et al., 2020). Os peptídeos fosfo/deglicosilados foram concatenados em 12 frações e os peptídeos não modificados concatenados em 20 frações, e subsequentemente secos por centrifugação a vácuo.

5.11. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ESPECTROMETRIA DE MASSA (MS) EM TANDEM

Todas as frações foram dissolvidas em tampão A (0,1% de ácido fórmico; FA) e carregadas em um sistema EASY-nLC (Thermo Scientific, Odense, Dinamarca) contendo uma coluna capilar de sílica fundida interna de 20 cm (100 µm de diâmetro interno) preenchida com material de fase reversa ReproSil-Pur C18 AQ de 1,9 µm (Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen, Alemanha). Os peptídeos foram eluídos com o seguinte gradiente cromatográfico (em porcentagem de solvente B): 1% a 25% por 100 minutos; 25% a 40% em 20 minutos; 40% a 95% em 1 minuto;

95% por 5 minutos; 95% a 1% em 1 minuto; e 1% por 5 minutos, com fluxo de 300 nl/min usando um gradiente de 132 minutos. A ionização foi realizada por nanospray e a análise foi feita por um Espectrômetro de Massa Orbitrap Exploris 480 (Thermo Scientific). O MS foi realizado na faixa de massa de 350 a 1200 m/z no Orbitrap com uma resolução de 120.000 FWHM, um valor de alvo de AGC normalizado de 300% e um tempo de injeção máximo no modo automático. Para cada MS, os 10 íons precursores mais intensos foram selecionados para fragmentação por dissociação induzida por alta energia de colisão (HCD), com uma energia de colisão normalizada de 32. Os parâmetros MS/MS foram: resolução de 45.000 FWHM, valor de alvo de AGC normalizado de 300%, tempo de injeção máximo de 100 ms para as frações não modificadas e 200 ms para as frações fosfo/deglicosiladas, janela de isolamento de 0,7 m/z e janela de exclusão dinâmica de 20 segundos.

5.12. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Os conjuntos de dados brutos de MS foram processados para identificação de proteínas usando o Proteome Discoverer (PD, v2.5, Thermo Scientific) e confrontados com o banco de dados humano do Swiss-Prot (20.594 entradas, 3 de setembro de 2022) usando um servidor MASCOT interno (v2.8.2, Matrix Science Ltd, Londres, Reino Unido) e o algoritmo de busca Sequest HT. A pesquisa no banco de dados foi realizada com os seguintes parâmetros: tolerância de massa do precursor de 10 ppm; tolerância de m/z de fragmento de 0,05 Da; enzima definida como tripsina permitindo no máximo 2 clivagens perdidas; modificações dinâmicas definidas como carbamidometilação (cisteína), oxidação (metionina) e, para os peptídeos fosfo/deglicosilados, a adição de fosforilação (serina, treonina e tirosina) e deamidação (asparagina); modificações estáticas definidas como TMT-pro (lisina e N-term) e um *false discovery rate* (FDR) de 1% para proteínas e peptídeos. A quantificação e a normalização das abundâncias foram realizadas pelo *Reporter Ions Quantifier node* do PD, com o modo Configurações Gerais de Quantificação para peptídeos únicos, o modo Normalização da Quantidade Total de Peptídeos e utilizando todos os peptídeos para normalização e *roll-up* de proteínas. Para análise bioinformática do proteoma total as frações não modificadas foram avaliadas à nível de proteína, enquanto para análise do fosfoproteoma e do sialoma as frações modificadas foram avaliadas à nível de peptídeos. Os valores de abundância normalizados das proteínas com pelo menos 2 peptídeos únicos e os fosfo/glicopeptídeos contendo ácido siálico foram transformados para logaritmo (base = 2) para obter uma distribuição normal para análises subsequentes. A análise quantitativa

foi realizada utilizando a ferramenta combinada de teste estatístico PolySTest (SCHWÄMMLE et al., 2020). Peptídeos ou proteínas significativamente reguladas entre grupos foram determinados com base no teste Limma com valor de p ajustado $< 0,05$, combinado com um \log_2 *Fold Change* de 1 (positiva ou negativa). Apenas os sítios glicosilados dentro da sequência de consenso (N-X-S/T/C - onde X é qualquer aminoácido, exceto prolina) foram selecionados para análise adicional. A probabilidade de localização de sítios fosforilação foi verificada nos conjuntos de dados MS/MS usando o PhosphoRS (TAUS et al., 2011) e apenas os sítios fosforilados com pelo menos 99% de probabilidade foram selecionados para análise adicional.

A caracterização funcional de proteínas reguladas e peptídeos modificados foi realizada no R (POSIT TEAM, 2022) e analisada com os pacotes Clusterprofiler (WU et al., 2021) e Enrichplot (YU, 2022) para análise estatística e gráficos. *Clusters* de proteínas ou peptídeos modificados foram analisados com base em seus nomes de genes em relação ao proteoma total como *background*, e os processos biológicos e vias foram avaliados com base na análise de super-representação (*over-representation analysis*, ORA) (BOYLE et al., 2004), utilizando as anotações da *Gene Ontology* (GO) e do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (NAM; KIM, 2008). A previsão de atividade das quinases foi realizada usando o pacote KinSwing (ENGHOLM-KELLER et al., 2019). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o método de Benjamini-Hochberg com um limite de valor de p e valor de q inferior a 0,05.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão apresentados na forma de dois artigos, sendo o primeiro referente ao estudo retrospectivo, e o segundo referente ao estudo proteômico.

6.1. PRIMEIRO ARTIGO

THE INVOLVEMENT OF COEXISTING EPITHELIAL AND MESENCHYMAL PHENOTYPE IN ENDOMETRIOTIC LESIONS IN THE PATHOPHYSIOLOGY OF DISEASE

Camila Pereira Almeida¹; Felipe Henrique de Souza Silva¹; Emerson Soares Veloso¹; Bárbara Andrade de Carvalho¹; Bruna Mendes Lima¹; Máira Casalechi²; Marcella Nunes de Melo-Braga³; Antônio Marcos Coldibelli Francisco⁴; Enio Ferreira¹; Fernando Marcos dos Reis²; Helen Lima Del Puerto¹

¹ Department of Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

² Department of Obstetrics and Gynecology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

³ Department of Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

⁴ Department of Bioethics, Universidade do Vale do Sapucaí, Pouso Alegre, MG, Brazil.

ABSTRACT

Objective: To investigate variations in the genic and protein immunolocalization and expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers in different endometriotic lesions compared to healthy endometrium.

Methods: Samples of control endometrium (CTR; n=4) from patients submitted to tubal ligation, and of eutopic endometrium (EE; n=6) and endometriotic lesions (LE; n=13) from endometriosis surgeries were collected and submitted to mRNA extraction and histological processing. Gene expression of E-cadherin, N-cadherin, SNAIL and ZEB1 was evaluated through qPCR. After morphological evaluation, protein expression of E-cadherin, N-cadherin, β -catenin and vimentin was performed by immunohistochemistry (IHC).

Results: E-cadherin gene expression was similar in all three groups. IHC analysis showed higher frequency of low E-cadherin expression in LE (11% vs. 25%; $p = 0,0159$) compared to CTR. In contrast, N-cadherin (0.13 vs. 1.05; $p < 0,0001$) and SNAIL (0.24 vs. 1.00; $p = 0,0026$) gene expression was downregulated in LE group compared to CTR, and ZEB1 was upregulated (1.37 vs. 0.30; $p = 0,0319$) in LE compared to EE. The LE group had high frequency of high protein expression for N-cadherin (22% vs. 0%; $p < 0.0001$) and membrane β -catenin (75% vs. 25%; $p < 0.0001$) compared to CTR.

Conclusion: Endometriotic epithelial cells demonstrate a partial EMT phenotype, expressing both epithelial and mesenchymal markers. E-cadherin expression in endometriotic lesions and

acquisition of N-cadherin expression support the mixed phenotype theory in endometriosis instead of a cadherin switch.

KEYWORDS: Endometriosis, epithelial-mesenchymal transition, cadherins, beta catenin, ZEB1.

INTRODUCTION

Endometriosis is a disease that affects 15% of women of reproductive age and is associated with severe pelvic pain, dyspareunia, gastrointestinal disorders, and difficulties in becoming pregnant [1]. Some pieces of the puzzle of the etiopathogenesis and pathophysiology of endometriosis have not yet been revealed. Therefore, practical scientific advances regarding the disease's prediction, prevention, and treatment remain inconclusive.

The origin and establishment of endometriotic lesions depend on a chain of biological events, including adhesion and infiltration of the peritoneal surface by endometriotic cells, proliferation, establishment, local survival, angiogenesis, and neurogenesis. These events are associated with inflammation at the implantation site, and the tissue microenvironment controls these phenomena, and various hormones and cellular components influence its regulation. Until then, the most significant focus was the hormonal component, with extensively studied ovarian hormones becoming the basis of current therapies and management of patients with endometriosis [1]. However, other biological mechanisms required for ectopic endometriotic tissue to infiltrate and invade, such as the epithelial-mesenchymal transition (EMT), are an important way to control and prevent disease progression.

EMT is a functional and gradual process of polarized epithelial cells towards a mesenchymal cell phenotype, being a relevant phenomenon in the regulation of different biological processes such as implantation and embryogenesis, the pathogenesis of malignant tumours, in addition to being associated with wound healing, regeneration tissue and fibrosis [2]. The molecular mechanism of EMT in epithelial cells involves the functional loss of epithelial phenotype molecules, such as E-cadherin, β -catenin, and keratin proteins, and increased expression of mesenchymal markers such as N-cadherin, Vimentin, muscle actin smooth, among others [3]. Epithelial cells of different origins, such as peritoneal, endothelial, and endometrial cells, are likely to undergo the EMT process, contributing to the development of endometriotic lesions

[4]. Several studies have already demonstrated the role of essential transcription factors in the regulation of EMT in the worsening of endometriosis: ZEB1, TWIST1, and SNAIL, associated with suppression of E-cadherin expression/release of β -catenin and increased expression of N-cadherin and vimentin promoting EMT and abnormal activation of endometriosis [5–7].

However, Konrad et. al. (2020) demonstrated in a review that changes in these EMT markers are minor between the eutopic endometrium of women with and without endometriosis. Additionally, few changes are observed in cell-cell contact markers, with no changes in the epithelial phenotype, suggesting that the EMT process occurs partially and is not a prerequisite for the detachment of endometrial cells from the eutopic endometrium of patients with endometriosis compared to the eutopic endometrium of patients without endometriosis and, therefore, would not be a critical process for the etiopathogenesis of the disease. However, significant changes in the expression of EMT-related markers were found in endometriotic lesions compared to eutopic endometrium, associated with reduced expression of epithelial markers in the lesions.

Therefore, the mechanisms behind changes in the expression of EMT markers have not yet been fully elucidated. Due to the clinical relevance of endometriosis and the scarcity of therapeutic approaches available, studies are needed to deepen the knowledge about the processes involved in the development of the lesions and the behaviour of EMT markers in endometriotic lesions. Thus, the present work aims to investigate the genic and protein expression of epithelial-mesenchymal transition markers in different endometriotic lesions compared to healthy endometrium.

MATERIAL AND METHODS

Ethics and samples collection

The Research Ethics Committee from Faculdade de Ciências Médicas Dr. José Antônio Garcia Coutinho – FACIMPA, Pouso Alegre, MG, Brazil, approved the study protocol under the number CAAE: 52182921.4.1001.5102. The participants signed for informed consent before being enrolled in the study.

Control endometrium (n=4) was collected from patients submitted to tubal ligation without any pelvic endometriosis determined by laparoscopy and no underlying conditions. The eutopic endometrium (n=6) and endometriotic lesions (n=13) samples were obtained from fresh

fragments of biopsies performed during surgeries to remove endometriotic lesions or surgeries for infertility investigation causes. Twenty-three samples from 17 patients were included. At the time of collection, part of the material was directed to histopathological analysis. The remaining tissue was placed in RNase and DNase-free microtubes containing 1 ml RNAlater® (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and stored at -20°C until RNA isolation.

Morphological analysis

Histological sections $4\ \mu\text{m}$ thick were cut and stained with hematoxylin and eosin and analysed by a double observer. The samples were analysed for endometriosis based on identifying epithelial and stromal histological elements compatible with the endometrium, the presence or absence of stroma, and associated signs of haemorrhage and fibrosis. After confirmation of endometriosis, the lesions were morphologically evaluated based on variations in the appearance of the ectopic endometrial structures found, according to the following: well-differentiated glandular pattern, undifferentiated glandular pattern, mixed glandular pattern, and pure stromal pattern [8].

RNA isolation, cDNA synthesis, and quantitative real-time PCR

Total RNA extraction was performed by homogenizing 50-100 mg tissue samples in Trizol (Invitrogen) reagent following the manufacturer's instructions. The first cDNA strand was synthesized using High-Capacity Reverse Transcription Kit (ThermoFisher-Applied Biosynthesis) in a $20\ \mu\text{l}$ reaction volume using random hexamers primers following the manufacturer's protocol. Real-time PCR was carried out in a QuantStudio™ 3 *Real-Time* PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA), using Power Sybr®Green Master Mix Kit (Invitrogen, Cat. No. 4368577). The cycling conditions were as follows: [1] one cycle of $50^{\circ}\text{C}/2\ \text{min}$; [2] one cycle at $95^{\circ}\text{C}/10\ \text{min}$; [3] 40 cycles of $95^{\circ}\text{C}/15\text{s}$, followed by melting curve from 60°C , for amplicon specificity analysis. Primers used in qPCR amplification for target genes E-cadherin, N-cadherin, ZEB1, Snail, and GAPDH are listed in table 1. Data were accessed by comparative CT method ($[\text{CT target gene mean}] - [\text{CT endogenous control mean}]$), as the endogenous control was used to normalize target gene expression and generate ΔCT .

Table 1: Primers sequence for real time PCR

Primers	Nucleotide Sequence (5'-3')	Fragment size	GenBank accession number
GAPDHForw	TGGGTGTGAACCATGAGAAG	125	NM_001289746.1
GAPDHRev	GAGTCCTTCCACGATACCAAAG		
E-CADForw	CCCTTCACAGCAGAACTAAC	108	NM_001317185.1
E-CADRev	CACCTCTAAGGCCATCTTTG		
N-CADForw	GGACCGAGAATCACCAAATG	94	NM_001308176.1
N-CADRev	CGTTCCTGTTCCACTCATAG		
SNAILForw	GCAGGACTCTAATCCAGAGTTTACC	127	NM_005985.4
SNAILRev	GACAGAGTCCAGATGAGCATT		
ZEB1Forw	GGGAGGATGACAGAAAGGAA	100	NM_001323654.1
ZEB1Rev	GCATCTGACTCGCATTTCATC		

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed using the peroxidase reaction method with a polymerized secondary antibody (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK). For antigen retrieval, sections were incubated for 20 min in Target Retrieval Solution Citrate pH 6.0 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) in a water bath at 98 °C. Slides sections were washed in PBS buffer, and endogenous peroxidase was blocked by incubating the slides twice, for 10 min, in 3% H₂O₂ in methanol solution. In addition, non-specific binding sites of endogenous proteins were blocked by incubation for 20 min in Protein Block Serum-Free Ready to Use reagent (Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA). The sections were then incubated with primary antibodies for 16 h at room temperature, followed by 3 min incubation with chromogen 3'3-diaminobenzidine (Liquid DAB + Substrate Chromogen System; Dako North America, Via Real Carpinteria, CA, USA). After DAB incubation, tissue slides were counterstained with hematoxylin for 30 seconds and rinsed with water for 5 minutes. The primary antibody step was omitted for the negative control, with its replacement by the antibody diluent (*Antibody Diluent with Background Reducing Components*; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA). Table 2 lists the characteristics of the antibodies and the reaction.

Table 2: IHC protocol for E-cadherin, N-cadherin, Vimentin and β -catenin antibodies

Antibody	Manufacturer	Clone	Dilution	Incubation time	Antigen retrieval
E-Cadherin	Invitrogen	4A2C7	1:50	16h	Citrate buffer + water bath
N-Cadherin	Dako	6G11	1:75	16h	Citrate buffer + water bath
Vimentin	Santa Cruz	Vim3B4	1:500	16h	Citrate buffer + water bath
β-catenin	Santa Cruz	sc-7963	1:200	16h	Citrate buffer + water bath

Immunohistochemistry staining was interpreted using conventional optical microscopy at 600x magnification (Olympus – BX41) and evaluated in endometrial and endometriotic epithelial cells. E-cadherin membrane/cytoplasmic staining, N-cadherin membrane/cytoplasmic staining, and β -catenin membrane/cytoplasmic and nuclear staining were classified according to the percentage of stained cells: 0 (absence of staining), 1 (< 25%), 2 (25-50%), 3 (50-75%), 4 (>75%) [9]. For vimentin, 500 cells (stained and not stained) were counted by a single evaluator, randomly using the *grid* plug-in of the ImageJ software (National Institutes of Health, NIH), and the result was given as a percentage of stained cells.

Statistical analysis

The gene expression data were normalized using the reference gene GAPDH through the Δ Ct method previously described. The relative gene expression was evaluated through the fold change with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ data [10]. Data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. To relate the semi-quantitative variables, due to the reduced number of samples, the cases were segmented into two large groups: below 50% of stained cells and above 50% of stained cells. Then comparisons were made with the Fisher's exact test. For analysis of quantitative variables, mean analysis was performed by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test or Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons post-test. Possible correlations were evaluated using the Spearman or Pearson test. The software used was GraphPad Prism 9, and statistical significance was considered when the p-value was $p < 0.05$.

RESULTS

Patients clinical features

The main clinical features of the patients enrolled in the study are summarized in table 3.

Table 3: Patients clinical features.

	Without Endometriosis (n=4)	With Endometriosis (n=13)	
	Control Endometrium	Eutopic Endometrium	Endometriotic Lesion
Number of samples	4	6	13
Age (mean \pm standard deviation)	35.5 \pm 10.8	33.7 \pm 5.1	35.4 \pm 5.2
Hormonal contraceptive/progestin	1	5	11
ASRM stage			
I	-	0	1
II	-	1	2
III	-	1	2
IV	-	4	8

ASRM: American Fertility Society classification

Were received 23 samples from 17 patients, 4 without endometriosis and 13 with endometriosis. The lesion samples came from biopsies of the following pelvic structures: rectum/sigmoid (n=6), uterosacral ligament (n=1), ureter (n=1), and peritoneum (n=5).

Morphological features of endometriotic lesions

The eutopic endometrium of patients without endometriosis (n=4) had typical morphological features from the early to mid-proliferative phase of the menstrual cycle: tubular glands of pseudostratified columnar epithelium, most of the nucleus with basal orientation and the absence of vacuolization. Epithelial cells had minor variations, presenting sometimes as cuboidal. The stroma had fusiform cells with dense nuclei and scant cytoplasm wisps, sometimes with edema (Fig 1A). Some haemorrhagic foci were observed, possibly due to the biopsy collection. Samples from the eutopic endometrium of patients with endometriosis had similar morphology and findings, with no difference from those without endometriosis.

Endometriotic lesions showed 2 of the 4 morphological patterns analysed: the well-differentiated pattern, with glandular or cystic epithelium formations containing cells indistinguishable from the eutopic endometrium during the different phases of the menstrual cycle (Fig 1B), and the undifferentiated pattern, with glandular or cystic formations consisting of cuboidal or flattened epithelial cells, with no resemblance with the eutopic endometrium (Fig 1C). Some samples presented both patterns. The stroma in the lesions had morphology like the eutopic endometrium, with minor variations of density and the presence of edema. Still, none of those variations had a correlation with the associated epithelia. Although rare areas presenting only stroma were observed, they were seen in samples that also showed glandular epithelia.

EMT gene expression in eutopic endometrium and endometriotic lesions

Eighteen out of the 23 samples were included in mRNA gene expression. All of those samples had homogenous amplification of the GAPDH reference gene. Three samples of eutopic endometrium were from patients without endometriosis (CTR), 6 samples of eutopic

endometrium from patients with endometriosis (EE), and 9 samples of endometriotic lesions (LE).

Down-regulation of N-cadherin mRNA expression was observed in the EE group (Fig 2B) (0.30 vs. 1.05; *one-way* ANOVA, $p=0.0001$) and LE (0.13 vs. 1.05; *one-way* ANOVA, $p<0.0001$) when compared to the CTR group. No significant difference in E-cadherin gene expression was found comparing all groups (Fig 2A). SNAIL gene expression was downregulated in EE (0.44 vs. 1.00; *one-way* ANOVA, $p=0.0272$) and LE groups (0.24 vs. 1.00; *one-way* ANOVA, $p=0.0026$) when compared to the CTR group (Fig 2C). Transcription factor ZEB1 gene expression had an upregulation in the LE group compared to the EE group (Fig 2D) (1.37 vs. 0.30; Kruskal-Wallis, $p= 0.0319$).

Eutopic endometrium and endometriotic lesions IHC expression of EMT main targets

Samples analysed by IHC were selected based on morphological characteristics by HE staining. Four samples of eutopic endometrium from patients without endometriosis (CTR), 4 samples of eutopic endometrium from patients with endometriosis (EE), and 9 samples of endometriotic lesions (LE) were submitted to protein immunolocalization by IHC.

E-cadherin protein immunolocalization and expression were detected in all samples, with membrane and cytoplasmic staining of epithelial cells in eutopic endometrium and endometriotic lesions. The glandular structures presented cells with positive and negative staining for E-cadherin (Fig 3 E-CAD). E-cadherin high expression was observed in 25% (1/4) of the CTR group, 33% (1/3) of the EE group, and 11% (1/9) of the LE group samples. There was a significant difference in the frequency of E-cadherin high expression in the lesions when compared with the eutopic endometrium of patients without endometriosis (LE x CTR; $p = 0.0159$) and with the eutopic endometrium of patients with endometriosis (LE x EE; $p = 0.0003$) (Fig 4A).

N-cadherin protein expression was positive in all samples, with membrane, cytoplasmic, and, in some cases, nuclear staining in epithelial and stromal cells (Fig 3 N-CAD). In epithelial cells, N-cadherin was highly expressed in 33% (1/3) of the EE group and 22% (2/9) of the LE group samples. There were no samples with high expression of N-cadherin in CTR group. It was

observed a significant difference in frequency of high expression cases in EE (EE x CTR; $p < 0.0001$) and LE (LE x CTR; $p < 0.0001$) groups when compared with CTR group (Fig 4B).

β -catenin IHC protein expression was observed in all analysed samples with membrane, cytoplasmic, and nuclear staining localization in epithelial and stromal cells (Fig 3 β -CAT). In epithelial cells, high membrane β -catenin expression was observed in 25% (1/4) of CTR group samples, in 75% (3/4) of the EE group, and in 75% (6/8) of LE group samples, with a significant difference in the frequency of high expression cases between the eutopic endometrium of patients with endometriosis and endometriotic lesions when compared with control endometrium (EE x CTR and LE x CTR; $p < 0.0001$) (Fig. 4C). None of the cases presented epithelial cells with high expression of nuclear β -catenin, and even though there was no nuclear staining in the samples of eutopic endometrium from patients without endometriosis, no significant differences between the groups were observed (Fig 4D).

Additionally, cytoplasmic immunolocalization and expression of vimentin protein were observed in all samples, mainly in the stroma and in epithelial cells of eutopic endometrium and lesions (Fig 3 VIM). Vimentin staining in epithelial cells was 43% in the CTR group, 65.5% in the EE group, and 70% in the LE group. There was no significant difference in vimentin IHC expression in epithelial cells between the groups (Fig 4E).

In addition, there was no correlation between the gene (qPCR) and protein (IHC) expression of the EMT targets analysed in case samples.

DISCUSSION

EMT has been extensively studied in several pathologies, and it is associated with malignant progression in tumours by altering cell adhesion properties and increasing invasiveness. However, the role of this process in endometriosis still faces contradictory results. This study shows that epithelial cells of endometriotic lesions have a “mixed” phenotype by keeping the expression of E-cadherin and membrane β -catenin and increasing the expression of the mesenchymal markers N-cadherin, vimentin, and ZEB1.

Morphological analysis showed no significant changes in the eutopic endometrium stroma and epithelia from patients with and without endometriosis. Endometriotic lesions presented a well-differentiated and undifferentiated glandular pattern, with a predominance of glands with more flattened epithelial cells. This could be associated with the use of combined oral contraceptives and progestins, which act as agonists of progesterone receptors and lead to the atrophy of epithelial and stromal endometrial/endometriotic cells [11]. Since that is the leading treatment choice for endometriosis, most of the patients enrolled in the study were under hormonal medication at the moment of sample collection (71%).

Considering that EMT goes through processes that alter cell differentiation, we could infer that the variations in the morphology of the glands observed in our cases would be related to the acquisition of a mesenchymal profile. However, conserving the tissue architecture for both epithelial and mesenchymal cells seem critical for the ectopic endometrium's ability to infiltrate and develop lesions *in vitro* [12]. A lower E-cadherin expression can also shift cell adhesion and migration profile without necessarily inducing cell morphological changes [13]. Therefore, the more aggressive and infiltrative profile associated with undifferentiated lesions is possibly due to morphology and other molecular changes, such as the expression of mesenchymal markers [8,14].

One of the main traits of EMT is the modification in the epithelial cells' gene expression, leading to a decrease in the expression of epithelial proteins usually present in the cell-cell and cell-matrix junctional complexes and changes in cytoskeleton proteins. That will favour the adhesion of epithelial cells to mesenchymal cells and alter the cellular interaction with ECM [2]. The decrease in E-cadherin expression is considered a hallmark of EMT, as it promotes the destabilization of the cell junction complexes, facilitating their detachment and release of the β -catenin, which, when translocated to the nucleus, plays an essential role in inducing the expression of mesenchymal markers such as Snail, Twist, ZEB1, and vimentin [3,15,16].

Although there were no significant differences in E-cadherin gene expression between eutopic endometrium samples of patients without endometriosis, with endometriosis, and in endometriotic lesions, most studies claim to find a lower gene expression of E-cadherin in endometriosis [17]. However, there is no description of E-cadherin total depletion in endometriotic epithelial cells, which would be indicative of the maintenance of an epithelial phenotype in endometriosis lesions, and that the loss of E-cadherin is not determinant for the

spread of endometriotic cells [4,17]. Indeed, the results showing a lower frequency of high E-cadherin protein expression in endometriotic lesions and the variation of positivity for this marker in the same glandular structure have also been described in different studies for both the lesions and the eutopic endometrium of endometriosis patients [18–20].

Another hallmark of EMT is balancing the reduction of E-cadherin with the increased expression of the cadherin associated with the mesenchymal profile (N-cadherin), resulting in the so-called cadherin switch, which alters cell adhesion patterns [3,13]. Our results showed a considerable reduction of N-cadherin gene expression in lesions compared to the control endometrium. Nonetheless, the endometrium of patients with endometriosis and endometriotic lesions presented a significantly higher frequency of cases with high protein immunohistochemistry expression of N-cadherin compared to the eutopic endometrium of patients without endometriosis. The majority of the studies demonstrate an increase of mesenchymal markers in lesions when compared to the eutopic endometrium, corroborating with the theory of a partial EMT in endometriotic epithelial cells [17,19–21]. Present results indicating E-cadherin expression in endometriotic lesions and acquisition of N-cadherin expression support the mixed phenotype theory in endometriosis instead of a cadherin switch.

It is described as a low or negative gene and protein expression of N-cadherin in the eutopic endometrium [6,19,20]. Nguyen *et al.* demonstrated a low gene expression of N-cadherin, specifically in epithelial cells of the proliferative phase endometrium, and a high protein expression of this marker only in the deeper glands of the basal layer of the endometrium, suggesting a role of N-cadherin in endometrial progenitor epithelial cells [22]. Therefore, it is possible that the variation observed in the immunostaining of N-cadherin in the eutopic endometrium of patients with endometriosis in our samples is due to the presence of basal layer glands that kept some positivity for N-cadherin.

E-cadherin and N-cadherin are coupled to the cytoplasm and anchored to the cytoskeleton through a protein complex formed by catenins α , β e γ . β -catenin is not only one of the main proteins of this complex, but it plays an important role in signalling pathways that can trigger EMT. When the destabilization of the cell junctions occurs, with the cleavage and degradation of E-cadherin, β -catenin loses its connection point with the cadherin and is also degraded. However, if there is a stimulus to activate the Wnt signalling pathways (through E2 or TGF- β , for example), β -catenin is protected from degradation by dephosphorylation, followed by

glycosylation, and it is translocated to the nucleus. There, β -catenin binds to T Cell Factor and Lymphocyte Enhancer binding Factor 1 (TCF/LEF1) and acts as a transcriptional factor for genes involved in EMT, such as vimentin, Snail, ZEB1, and Twist [3,15,16,23–26].

Endometriotic lesions and eutopic endometrium of patients with endometriosis had a significantly higher frequency of cases with increased membrane protein expression β -catenin when compared to control endometrium. Together with low nuclear immunostaining of β -catenin in all groups, these results suggest that the Wnt/ β -catenin signalling pathway may not be involved in the pathogenesis of these lesions. To date, there are few studies evaluating the role of β -catenin in endometriosis, and the results are still controversial, pointing from reduction and maintenance to increased expression of β -catenin in lesions [15,27–29]. Furthermore, some of these studies did not evaluate the nuclear staining, do not specify the type of lesion used in the study, or performed the evaluations only on ovarian lesions, hindering a comparative analysis of the results since the induction of specific factors in EMT seems to be local-dependent.

The high expression of β -catenin observed in the membrane of endometriotic lesions does not exclude the possibility of endometriotic epithelial cells exhibiting a mixed epithelial/mesenchymal phenotype since the β -catenin is involved in the anchorage of both E and N cadherins. But other pathways that do not have β -catenin as an intermediate may induce the mesenchymal phenotype.

The expressive cytoplasmic staining of β -catenin in the epithelial cells of lesions, associated with low nuclear staining, may indicate changes in β -catenin phosphorylation and glycosylation patterns, preventing its translocation to the nucleus and transcriptional activities [26]. The accumulation of β -catenin in the cytoplasm and deregulation in its phosphorylation/degradation are associated with apoptosis resistance and changes in cell migration. However, further studies involving intermediate molecules of this pathway are needed to deepen this hypothesis [3].

As a second mesenchymal marker evaluated, vimentin had a higher, but non-significant, immunostaining in lesion samples compared to eutopic endometrium samples, suggesting a possible increase in the migratory capacity of endometriotic epithelial cells. Vimentin is physiologically expressed in the eutopic endometrium, especially during the proliferative

phase. Like β -catenin, its expression in the epithelium of endometriotic lesions has controversial results [30,31]. Some studies point to a lower expression of vimentin in lesions compared to the eutopic endometrium, and others demonstrate a higher expression of this marker in ovarian and peritoneal lesions [15,20,30–34]. Altered expression of cytoskeleton molecules also contributes to EMT since filaments like vimentin regulate organelles and membrane-associated proteins traffic. [3]. Thus, despite the disagreement about its expression in endometriosis, our results suggest that vimentin possibly has a role in establishing the mixed profile in endometriotic lesions, favouring the invasion of pelvic structures.

To make a preliminary evaluation of the transcription factors involved in regulating EMT markers, we investigated the gene expression of SNAIL and ZEB1 in endometriotic lesions. SNAIL's observed lower gene expression and higher gene expression of ZEB1 in endometriosis lesions suggest distinct activation pathways of those transcription factors in these samples. Many factors can activate both SNAIL and ZEB1. Considering the IHC results, we hypothesize that the lower nuclear staining of β -catenin in lesion samples had a more significant impact on activating the activation of SNAIL gene expression. Different from what the observed in the samples used in the present study, most works point to a higher gene and protein expression of SNAIL in endometriosis [15,19,33]. Therefore, we believe that it is necessary to evaluate the protein expression of these transcription factors in a more significant number of cases.

The few existing studies evaluating ZEB1 expression in endometriosis demonstrate an increase of this transcription factor in the lesions [32,34,35]. ZEB1 is associated with e-cadherin repression and EMT activation, and even though there was no variation in e-cadherin gene expression in the lesions compared to the eutopic endometrium, the lesions showed a lower frequency of high E-cadherin expression. This suggests that ZEB1 may play a regulatory role in the protein expression of E-cadherin in these samples. However, as mentioned earlier, evaluating the protein expression of these transcription factors is still necessary.

In conclusion, our results point to a "mixed" epithelial/mesenchymal phenotype, or a partial epithelial-mesenchymal transition in the epithelial cells of human endometriotic lesions evaluated, associated with concomitant immunostaining of E- and N-cadherin, β -catenin and vimentin. However, further analysis of intermediate markers of the involved signaling pathways is necessarily better for understanding the impacts of this mixed phenotype in endometriosis.

REFERENCES

- [1] K.T. Zondervan, C.M. Becker, K. Koga, S.A. Missmer, R.N. Taylor, P. Viganò, Endometriosis, *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4 (2018) 9. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0008-5>.
- [2] R. Kalluri, R.A. Weinberg, The basics of epithelial-mesenchymal transition, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.
- [3] S. Lamouille, J. Xu, R. Derynck, Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>.
- [4] Y.-M. Yang, W.-X. Yang, Epithelial-to-mesenchymal transition in the development of endometriosis, *Oncotarget.* 8 (2017) 41679–41689. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16472>.
- [5] D. Lin, Q. Huang, R. Wu, S. Dai, Z. Huang, L. Ren, S. Huang, Q. Chen, Long non-coding RNA AFAP1-AS1 promoting epithelial-mesenchymal transition of endometriosis is correlated with transcription factor ZEB1, *Am. J. Reprod. Immunol.* (2018) e13074. <https://doi.org/10.1111/aji.13074>.
- [6] Y. Xiong, Y. Liu, W. Xiong, L. Zhang, H. Liu, Y. Du, N. Li, Hypoxia-inducible factor 1 α -induced epithelial-mesenchymal transition of endometrial epithelial cells may contribute to the development of endometriosis, *Hum. Reprod.* 31 (2016) 1327–1338. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew081>.
- [7] V. Baranov, O. Malysheva, M. Yarmolinskaya, Pathogenomics of endometriosis development, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19071852>.
- [8] M.S. Abrao, R.M. Neme, F.M. Carvalho, J.M. Aldrighi, J.A. Pinotti, Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment, *Int. J. Gynecol. Obstet.* 82 (2003) 31–40. [https://doi.org/10.1016/S0020-7292\(03\)00079-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7292(03)00079-1).
- [9] C.P. Prasad, G. Rath, S. Mathur, D. Bhatnagar, R. Parshad, R. Ralhan, Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK3 β in invasive ductal carcinoma of breast, *BMC*

- Cancer. 9 (2009) 325. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-325>.
- [10] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *Methods*. (2001). <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [11] A. Dinh, I. Sriprasert, A.R. Williams, D.F. Archer, A review of the endometrial histologic effects of progestins and progesterone receptor modulators in reproductive age women, *Contraception*. 91 (2015) 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2015.01.008>.
- [12] A.W. Nap, P.G. Groothuis, A.Y. Demir, J.W.M. Maas, G.A.J. Dunselman, A.F.P.M. de Goeij, J.L.H. Evers, Tissue integrity is essential for ectopic implantation of human endometrium in the chicken chorioallantoic membrane, *Hum. Reprod*. 18 (2003) 30–34. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg033>.
- [13] M. Maeda, K.R. Johnson, M.J. Wheelock, Cadherin switching: Essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition, *J. Cell Sci*. 118 (2005) 873–887. <https://doi.org/10.1242/jcs.01634>.
- [14] G. Kamergorodsky, P.A.A. Ribeiro, M.A.L. Galvão, M.S. Abrão, N. Donadio, N.L. de Barros Moreira Lemos, T. Aoki, Histologic classification of specimens from women affected by superficial endometriosis, deeply infiltrating endometriosis, and ovarian endometriomas, *Fertil. Steril*. 92 (2009) 2074–2077. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.086>.
- [15] W. Xiong, L. Zhang, H. Liu, N. Li, Y. Du, H. He, Z. Zhang, Y. Liu, E2 -mediated EMT by activation of β -catenin/Snail signalling during the development of ovarian endometriosis, *J. Cell. Mol. Med*. 23 (2019) 8035–8045. <https://doi.org/10.1111/JCMM.14668>.
- [16] C. Gilles, M. Polette, M. Mestdagt, B. Nawrocki-Raby, P. Ruggeri, P. Birembaut, J.M. Foidart, Transactivation of vimentin by β -catenin in human breast cancer cells, *Cancer Res*. 63 (2003) 2658–2664. <https://doi.org/10.1136/ijgc-00009577-200303001-00219>.
- [17] L. Konrad, R. Dietze, M.A. Riaz, G. Scheiner-Bobis, J. Behnke, F. Horné, A. Hoerscher,

- C. Reising, I. Meinhold-Heerlein, Epithelial–Mesenchymal Transition in Endometriosis—When Does It Happen?, *J. Clin. Med.* 9 (2020) 1915. <https://doi.org/10.3390/jcm9061915>.
- [18] R. Gaetje, S. Kotzian, G. Herrmann, R. Baumann, A. Starzinski-Powitz, Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin., *Am. J. Pathol.* 150 (1997) 461–7. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(88\)80043-8](https://doi.org/10.1016/0731-7085(88)80043-8).
- [19] J. Bartley, A. Jülicher, B. Hotz, S. Mechsner, H. Hotz, Epithelial to mesenchymal transition (EMT) seems to be regulated differently in endometriosis and the endometrium, *Arch. Gynecol. Obstet.* 289 (2014) 871–881. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-3040-4>.
- [20] S. Matsuzaki, C. Darcha, Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis†, *Hum. Reprod.* 27 (2012) 712–721. <https://doi.org/10.1093/humrep/der442>.
- [21] C. Poncelet, M. Leblanc, F. Walker-Combrouze, D. Soriano, G. Feldmann, P. Madelenat, J.Y. Scoazec, E. Daraï, Expression of cadherins and CD44 isoforms in human endometrium and peritoneal endometriosis, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 81 (2002) 195–203. <https://doi.org/10.1034/J.1600-0412.2002.810302.X>.
- [22] H.P.T. Nguyen, L. Xiao, J.A. Deane, K.S. Tan, F.L. Cousins, H. Masuda, C.N. Sprung, A. Rosamilia, C.E. Gargett, N-cadherin identifies human endometrial epithelial progenitor cells by in vitro stem cell assays, *Hum. Reprod.* 32 (2017) 2254–2268. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEX289>.
- [23] J. Xu, S. Lamouille, R. Derynck, TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition, *Cell Res.* 19 (2009) 156–172. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>.
- [24] J. Heuberger, W. Birchmeier, Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A002915>.

- [25] L. Wu, Z. Zhou, S. Han, J. Chen, Z. Liu, X. Zhang, W. Yuan, J. Ji, X. Shu, PLAGL2 promotes epithelial-mesenchymal transition and mediates colorectal cancer metastasis via β -catenin-dependent regulation of ZEB1, *Br. J. Cancer*. 122 (2020) 578–589. <https://doi.org/10.1038/S41416-019-0679-Z>.
- [26] R. Sayat, B. Leber, V. Grubac, L. Wiltshire, S. Persad, O-GlcNAc-glycosylation of β -catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity, *Exp. Cell Res.* 314 (2008) 2774–2787. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.05.017>.
- [27] S. Scotti, P.A. Regidor, A.E. Schindler, E. Winterhager, Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis, *Mol. Hum. Reprod.* 6 (2000) 610–617. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/6.7.610>.
- [28] M. Ueda, Y. Yamashita, M. Takehara, Y. Terai, K. Kumagai, K. Ueki, K. Kanda, Y.-C. Hung, M. Ueki, Gene expression of adhesion molecules and matrix metalloproteinases in endometriosis, *Gynecol. Endocrinol.* 16 (2002) 391–402. <https://doi.org/10.1080/gye.16.5.391.402>.
- [29] R. Shaco-Levy, S. Sharabi, D. Benharroch, B. Piura, N. Sion-Vardy, Matrix metalloproteinases 2 and 9, E-cadherin, and β -catenin expression in endometriosis, low-grade endometrial carcinoma and non-neoplastic eutopic endometrium, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 139 (2008) 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2008.01.004>.
- [30] I.O. SONG, S.R. HONG, Y. HUH, K.J. YOO, M.K. KOONG, J.Y. JUN, I.S. KANG, Expression of Vimentin and Cytokeratin in Eutopic and Ectopic Endometrium of Women with Adenomyosis and Ovarian Endometrioma, *Am. J. Reprod. Immunol.* 40 (1998) 26–31. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1998.tb00384.x>.
- [31] M. Nisolle, F. Casanas-Roux, J. Donnez, Coexpression of cytokeratin and vimentin in eutopic endometrium and endometriosis throughout the menstrual cycle: evaluation by a computerized method, *Fertil. Steril.* 64 (1995) 69–75. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)57657-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)57657-2).
- [32] L. Konrad, J. Gronbach, F. Horné, E.O. Mecha, E. Berkes, M. Frank, S. Gattenlöhner,

- C.O.A. Omwandho, F. Oehmke, H.R. Tinneberg, Similar Characteristics of Endometrial and Endometriotic Epithelial Cells, *Reprod. Sci.* 26 (2019) 49–59. <https://doi.org/10.1177/1933719118756745>.
- [33] X. Cai, M. Shen, X. Liu, S.W. Guo, Reduced Expression of Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit e and Its Possible Involvement in the Epithelial–Mesenchymal Transition in Endometriosis, *Reprod. Sci.* 25 (2018) 102–109. <https://doi.org/10.1177/1933719117702248>.
- [34] R.-F. Wu, Z.-X. Chen, W.-D. Zhou, Y.-Z. Li, Z.-X. Huang, D.-C. Lin, L.-L. Ren, Q.-X. Chen, Q.-H. Chen, High expression of ZEB1 in endometriosis and its role in 17 β -estradiol-induced epithelial-mesenchymal transition, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 11 (2018) 4744. [/pmc/articles/PMC6962925/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35812345/) (accessed January 22, 2022).
- [35] M. Furuya, H. Masuda, K. Hara, H. Uchida, K. Sato, S. Sato, H. Asada, T. Maruyama, Y. Yoshimura, H. Katabuchi, M. Tanaka, H. Saya, ZEB1 expression is a potential indicator of invasive endometriosis, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 96 (2017) 1128–1135. <https://doi.org/10.1111/AOGS.13179>.

FIGURES

Figure 1: Histological features of control endometrium and endometriotic lesions. (A) Eutopic endometrium of control patient, with typical morphological characteristics of the proliferative phase of menstrual cycle. (HE, 200X, *insert* 600X) (B) Endometriotic lesion of well-differentiated glandular pattern, showing epithelial cells indistinguishable from eutopic endometrium during the different phases of the menstrual cycle (Sigmoid fragment, HE, 200X, *insert* 600X) (C) Endometriotic lesion of undifferentiated glandular pattern, showing a cystic glandular formation with flattened epithelial cells, with no correspondence with eutopic endometrium, but resembling the mesothelium lining of the peritoneum (Sigmoid fragment, HE, 200X, *insert* 600X). Black arrows: glandular epithelial cells of eutopic endometrium or endometriotic lesions. Red star: eutopic endometrium or endometriotic lesions stroma.

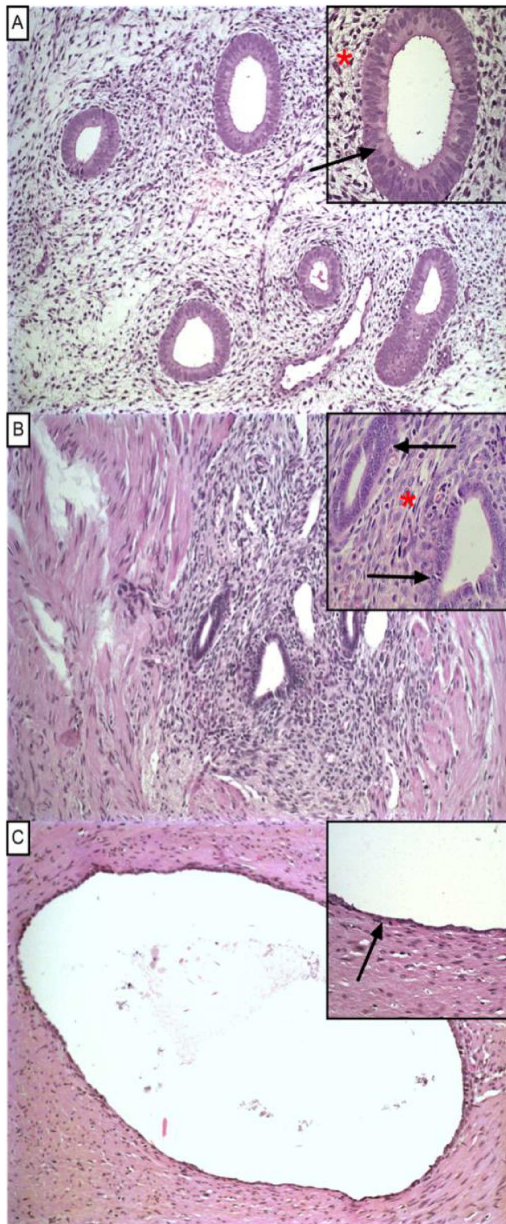


Figure 2: Relative expression of EMT target genes. E-CAD (A), N-CAD (B), SNAIL (C) e ZEB1 (D) in control eutopic endometrium (CTR), eutopic endometrium of endometriosis patients (EE) and endometriotic lesions (LE). Relative expression compared by *one-way* ANOVA and expressed as mean \pm standard error of the mean (E-CAD, N-CAD and SNAIL), or by Kruskal-Wallis test and expressed as median and interquartile range (ZEB1). * $p < 0.05$; *** $p = 0.0001$; **** $p < 0.0001$.

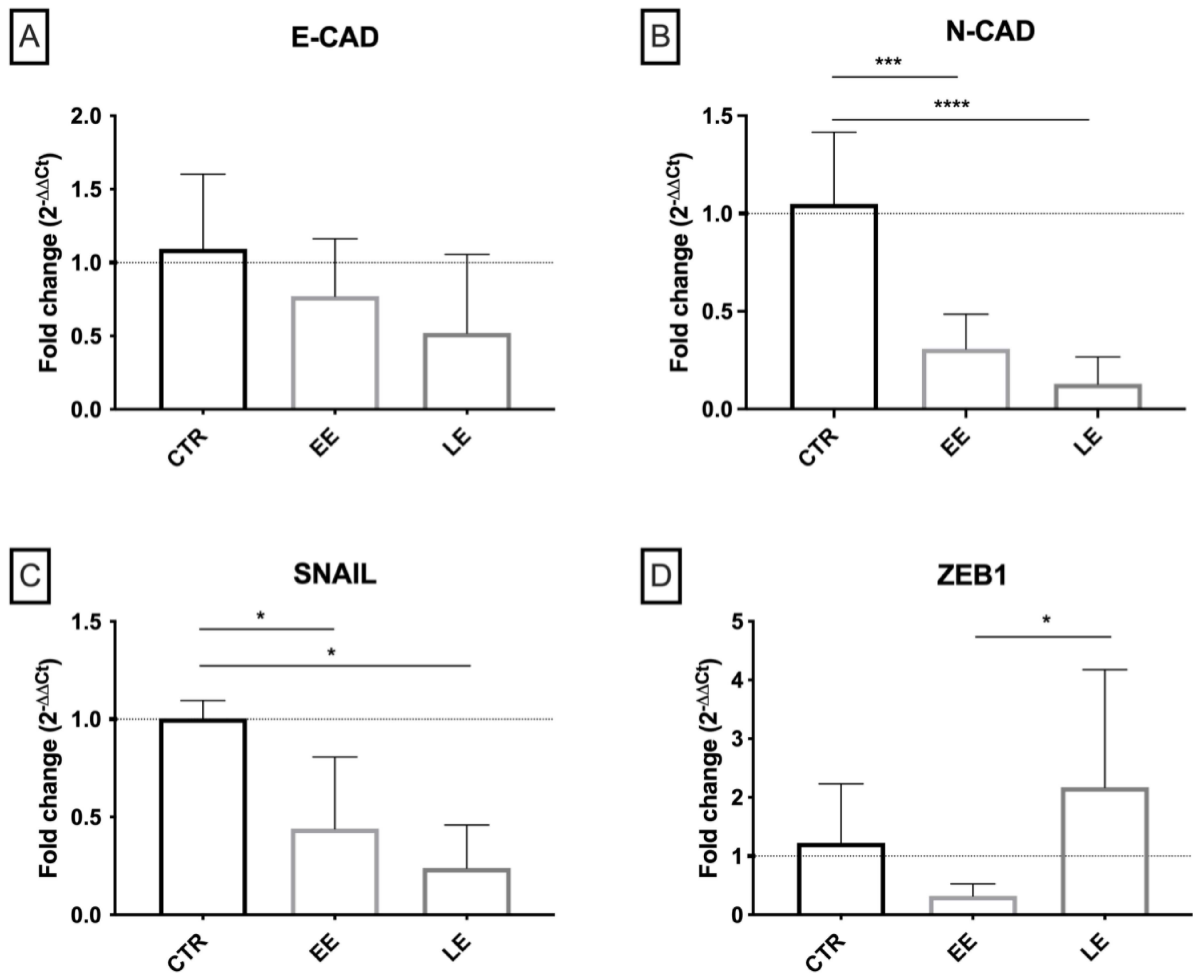


Figure 3: Immunostaining of EMT targets. Protein expression of E-cadherin (E-CAD), N-cadherin (N-CAD), β -catenin (β -CAT) and Vimentin (VIM) in control eutopic endometrium (CTR), eutopic endometrium of endometriosis patients (EE) and endometriotic lesions (LE). 600X. Black arrows: areas represented on the insert (1000X). Red stars: nuclear staining.

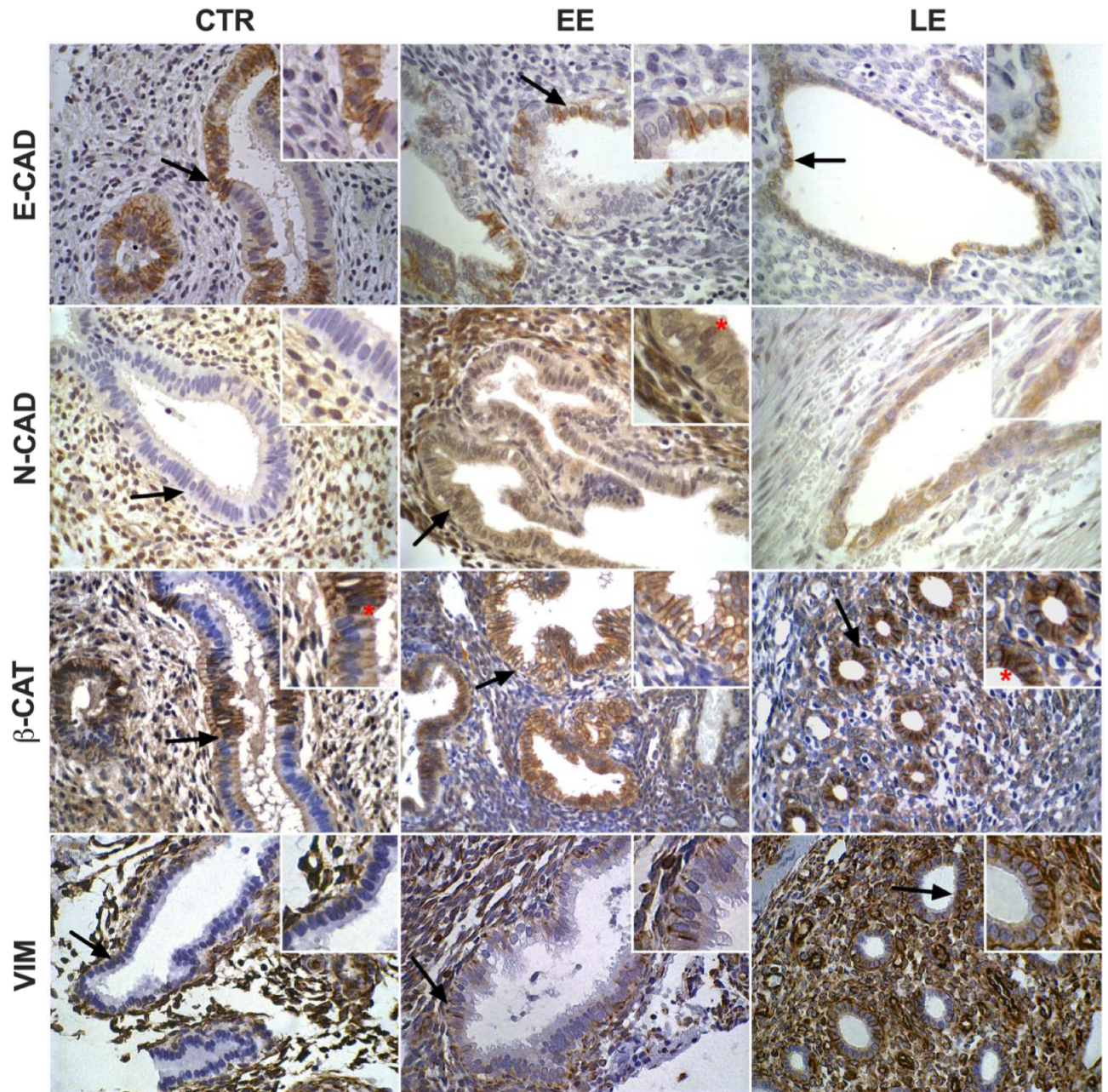
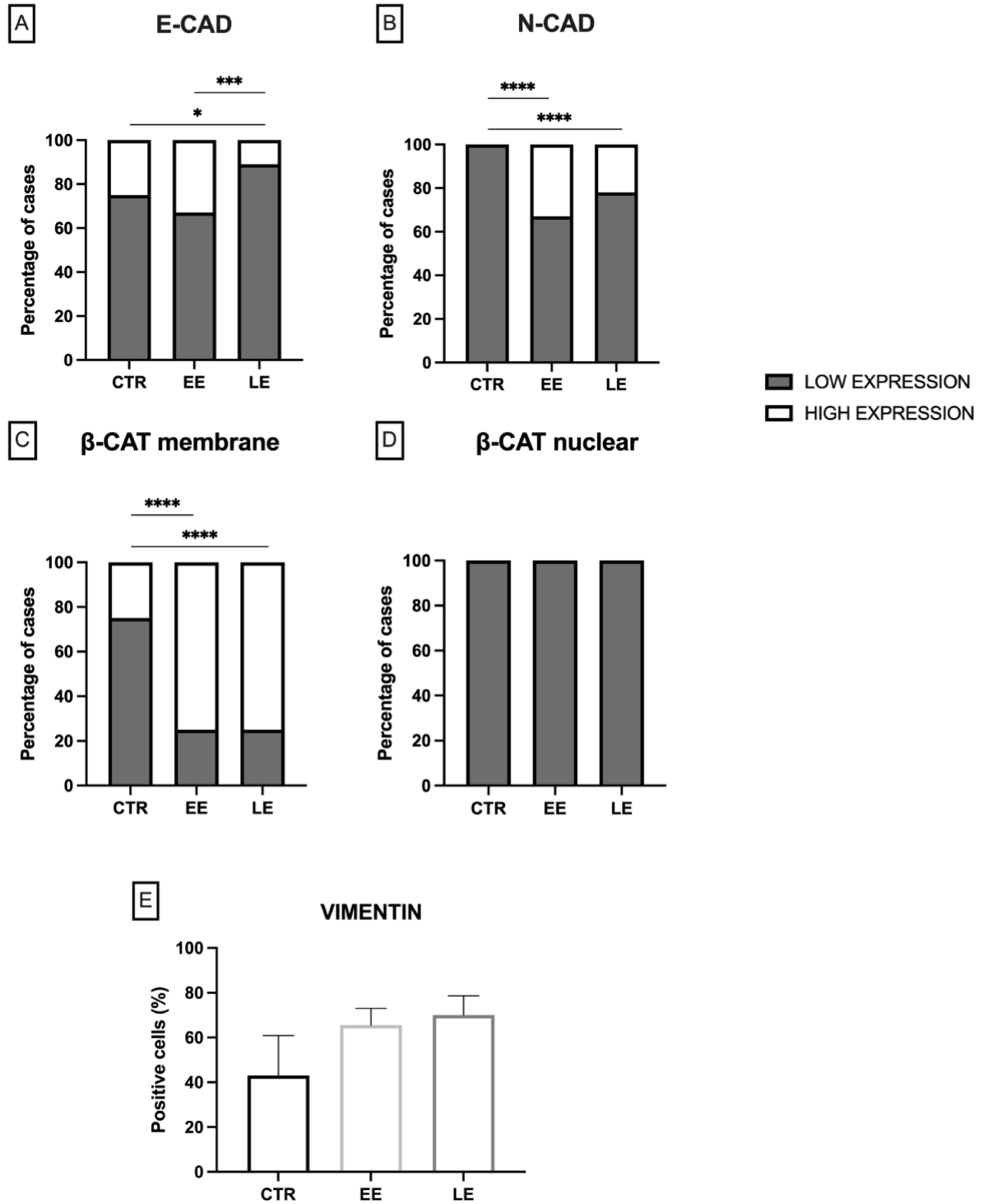


Figure 4: Immunostaining frequency of EMT main targets. Percentual distribution of control eutopic endometrium (CTR), eutopic endometrium of endometriosis patients (EE) and endometriotic lesions (LE) cases, based in their low or high expression of (A) E-cadherin, (B) N-cadherin, (C) membrane β -catenin, (D) nuclear β -catenin, Fisher's exact test. Percentual staining for (E) Vimentin compared by *one-way* and expressed as mean \pm standard error of the mean. * $p < 0,05$; *** $p = 0,001$; **** $p < 0,0001$.



6.2. SEGUNDO ARTIGO

DIFFERENTIAL PROTEOMIC AND PTMOMIC PROFILE OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION AND CELL ADHESION MARKERS IN ENDOMETRIOTIC LESIONS

Camila Pereira Almeida¹; Felipe Henrique de Souza Silva¹; Bárbara Andrade de Carvalho¹; Arkadiusz Nawrocki²; Aline Faria Rosa³; Silvânia de Cássia Vieira Archangelo³; Fernando Marcos dos Reis⁴; Antônio Marcos Coldibelli Francisco⁵; Enio Ferreira¹; Martin Røssel Larsen²; Marcella Nunes de Melo-Braga⁶; Helen Lima Del Puerto¹

1 Department of Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

2 Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark (SDU), Odense, Denmark

3 Department of Gynecological Endoscopy, Clinical Hospital Samuel Libânio-UNIVÁS, Pouso Alegre, Minas Gerais, Brazil

4 Department of Obstetrics and Gynecology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

5 Department of Bioethics, Universidade do Vale do Sapucaí, Pouso Alegre, MG, Brazil.

6 Department of Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

ABSTRACT

The Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) may contribute to endometriosis development, altering cell adhesion molecules and pathways, promoting migratory and invasive properties in ectopic endometrium. This study investigates the proteome and post-translational modifications

(PTMs) of EMT proteins in peritoneal endometriosis. Mass spectrometry-based analysis was performed on human control endometrium (CE), control peritoneum (CP), endometrium of patients with endometriosis (EE), and endometriotic lesions (EL). While overall expression profiles were similar, EL exhibited significant regulations: 276 in the proteome, 2240 in the phosphoproteome, and 481 in the sialic acid (SA) glycoproteome compared to EE. Gene ontology and KEGG pathways enriched for actin cytoskeleton contraction, cell-substrate adhesion, ECM-receptor interaction, and focal adhesion were identified. Downregulated phosphosites identified in E-cadherin, p120-catenin, and Twist 2 could potentially increase cell adhesion in EL. Conversely, upregulated phosphosites in the actin-binding proteins actinin, filamin A, and vinculin may lead to disruptions in the cytoskeleton and decreased cell adhesion. This balance between increased and decreased cell adhesion in endometriotic lesions suggests cellular changes that contribute to endometriosis development. Our findings emphasize the role of phosphorylation and SA glycosylation in maintaining adherens junction integrity in endometriosis and provide insights for future research on post-translational modifications in EMT regulation during endometriosis establishment.

Key words: endometriosis; epithelial-mesenchymal transition; phosphoproteome; sialome; cell adhesion; e-cadherin; p120-catenin; adherens junctions; focal adhesion.

INTRODUCTION

Endometriosis is a complex disease that affects around 15% of women at reproductive age and is characterized by the growth of endometrial-like tissue outside the uterus such as the pelvic peritoneum, uterosacral ligaments, bowels, ovaries, and bladder, which can lead to chronic pain, infertility, and other symptoms. The physiopathology of endometriosis is not fully understood. Still, research suggests that it may involve the abnormal migration and survival of ectopic endometrial cells, along with poor immune response, chronic inflammation, and hormonal imbalance [1].

One potential mechanism of endometriosis progression is the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), which leads to the dysfunction of cell adhesion molecules and pathways,

promoting enhanced migratory capacity, invasive ability, and increased apoptosis resistance of ectopic endometrium. Also, EMT can contribute to endometriosis progression by elevating the production of extracellular matrix (ECM) components, such as collagen and fibronectin, providing a scaffold for cell migration [2–4]. One important hallmark of the process is the expression of EMT-inducing transcription factors (SNAIL, ZEB, and TWIST families), causing the loss of E-cadherin and β -catenin expression. Several studies have described an altered expression of these key EMT markers in endometriosis. However, there are still many gaps in understanding how it affects the signaling mechanisms and disease progression [5–9].

E-cadherin is a transmembrane protein that functions as a cell-cell adhesion molecule in epithelial cells. It forms homotypic interactions between adjacent cells, helping to hold them together and maintain the integrity of the epithelial sheet. [10]. The linkage between E-cadherin and the actin cytoskeleton occurs through the adherens junction complex, with α , β and p120 catenins, that helps to anchor the cells to one another and provides mechanical strength to the epithelial sheet. β -catenin also has a role in the Wnt signaling pathway, which regulates cell proliferation and differentiation, and is involved in forming cell-cell junctions [10,11]. In endometriosis, epithelial endometriotic cells seems to have a decreased expression of E-cadherin and β -catenin, especially after their implantation, but they still keep a low expression of both markers, suggesting that the maintenance of these factors might play a role in the development of the disease [7].

Post-translational modifications (PTMs) such as glycosylation and phosphorylation are crucial in regulating many EMT markers [12], including the relationship between E-cadherin and the rest of the adherens junctions complex. N-glycosylation of E-cadherin with hybrid and complex N-glycans affects its cell-membrane expression and reduces cellular adhesion by interfering with the recruitment of β -catenin and p120-catenin, and also disrupts adherens junctions organization and E-cadherin anchorage to the actin cytoskeleton [13–16]. Also, removing specific N-glycans of the E-cadherin structure leads to the tyrosine phosphorylation of β -catenin, disrupting the linkage of these two proteins [17].

Moreover, the E-cadherin binding domain is highly regulated through the phosphorylation of S840, S846, and S847 residues by casein kinase 2 (CKII) and glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 β), allowing high-affinity β -catenin binding, cell adhesion, and surface stability of E-

cadherin. When unphosphorylated at these three serine sites, cell adhesion is compromised due to enhanced endocytosis and lysosomal degradation of E-cadherin [18–20].

Understanding the glycosylation and phosphorylation patterns of the EMT markers may provide new insights into the development of endometriosis and the identification of new therapeutic targets. There is evidence of E-cadherin phosphorylation (S838 and S840) and integrin–FAK activity in the presence of TGF- β 1 in an endometriosis murine model and also *in vitro* [21]. However, there is still no broad description about the phosphorylation and sialic acid (SA) N-linked glycosylation profile of EMT markers, and the possible effects in downstream signaling pathways in human endometriotic lesions. Therefore, this study aims to investigate the expression of EMT proteins in human peritoneal endometriosis by profiling their total proteome (TP) and PTMome (phosphorylation and SA N-glycosylation).

METHODS

Patients and Study Design

Human endometrium tissue samples, endometriotic lesions samples and healthy peritoneum samples used in this study were collected prospectively from nine patients undergoing laparoscopic surgery in Clinical Hospital “Samuel Libânio” (CHSL) or Hospital and Maternity Santa Paula (HMSP), Pouso Alegre, Minas Gerais, Brazil, between November 2021 and May 2022. The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of Faculdade de Ciências Médicas Dr. José Antônio Garcia Coutinho – FACIMPA, Pouso Alegre, MG, Brazil, under protocol number CAAE: 52182921.4.1001.5102 and written informed consent was obtained from all the participants.

The nine patients’ samples were divided as follows. Three patients submitted to tubal ligation without any pelvic endometriosis determined by laparoscopy and no underlying conditions had biopsies collected from the endometrium and peritoneum associated with the uterosacral ligament for the Control Endometrium (CE) and Control Peritoneum (CP) groups. Six patients undergoing laparoscopic surgery to investigate infertility causes or for endometriosis treatment had biopsies collected from the endometrium and endometriotic lesions from the uterosacral ligament for the Endometriosis Endometrium (EE) and Endometriosis Lesion (EL) groups. The

diagnostic was based on the visualization of endometriotic lesions and histopathology criteria, and the stage of the endometriosis was assessed according to the revised classification of the American Fertility Society [22]. All samples were collected during the secretory phase of the menstrual cycle (when applied), and the clinical characteristics of patients are summarized in Table 1.

All samples were snap frozen in liquid nitrogen after being dissected in 4 °C PBS and stored in liquid nitrogen until processing.

Table 1: Patients clinical features

	Control		Endometriosis	
	Endometrium	Peritoneum	Endometrium	Lesions
Number of cases	3	3	6	6
Age (mean ± SD)	34 ± 1.73	34 ± 1.73	40 ± 8.67	40 ± 8.67
Hormonal contraceptive/progestin	1	1	6	6
ASRM stage				
	I		2	2
	II		2	2
	III		-	-
	IV		2	2

Protein Extraction and Digestion

Endometrium (control and endometriosis), peritoneum and endometriotic lesions were homogenized in TRI Reagent using 1 ml per 50–100 mg of tissue, using a tissue homogenizer, and the protein were extracted according to the protocol provided by the manufacturer. All reagents were purchased from Sigma (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA)

The extracted protein pellets were washed 3 times with 0.3 M guanidine hydrochloride in 95% ethanol solution, using 2 ml per 1 ml of TRI Reagent. Samples were incubated with wash solution for 20 minutes at RT and then centrifuged at 7,500 g for 5 minutes at 4 °C (Kang et al., 2021 with modifications). After the last wash, the supernatant was removed and the pellet was washed with 2 ml of 100% ethanol, vortexed, incubated for 20 minutes at RT and centrifuged at 7,500 g for 5 minutes at 4 °C. The supernatant was discarded, and the pellet dried under vacuum centrifugation.

Pellets were resuspended in a solution containing 1% SDS, 0.2% sodium deoxycholate (SDC), protease inhibitor (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail - Roche) and phosphatase inhibitor (PhosSTOP - Roche) in 100 mM TEAB (pH 8.0). The sample was sonicated 2-5 times for 20 seconds at 40% amplitude in ice, and centrifuged at 3,200 g for 10 minutes at 4 °C. The supernatant was incubated with 10 mM dithiothreitol (DTT) at 60 °C for 10 min. After cooling to RT, the samples were incubated with 25 mM iodoacetamide for 30 min in the dark.

Next, the chloroform/methanol precipitation was performed as previously described with adaptation [24]. Briefly, 100 µL of each sample was mixed with methanol, chloroform, and distilled water (4:1:3, v/v/v), and then centrifuged at 14,000 g for 1 min at RT. The supernatant was carefully discarded and 0.4 mL of methanol was added to the cloudy protein ring in the interphase/lower chloroform phase, followed by vortex and centrifugation at 20,000 g for 5 minutes at RT. Methanol was removed and the protein pellets were dried under vacuum centrifugation. The pellets were dissolved in 100 µL of 0.2% sodium deoxycholate in 50 mM TEAB (pH 8.0) and incubated in the sonicate bath for 5 minutes. Trypsin (Promega, Madison, WI, USA) was added to the samples (1:50, w/w) and the solution was incubated overnight at 37 °C. The phase transfer-assisted removal of SDC was performed as previously described [25].

Finally, the samples were resuspended with 2% formic acid (FA), centrifuged at 20,000 g for 5 minutes at RT to remove possible SDC residues and the supernatant was dried again for TMT labelling.

TMT Labelling

The sample was resuspended in 100 mM HEPES buffer (pH 8.5) to achieve a concentration of 2 µg/µL and quantification was confirmed using Qubit Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). A total of 50 µg of each sample were labelled with the TMTpro™ 18-plex (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The 18 samples, divided into 4 groups, were labelled as: i) Control Endometrium (CE): 128N, 128C and 129N; ii) Control Peritoneum (CP): 126, 127N and 127C; iii) Endometriosis Endometrium (EE): 131N, 131C, 132N, 134N, 134C and 135; and iv) Endometriosis Lesion (EL): 129C, 130N, 130C, 132C, 133N and 133C (Table S1). After labelling, the peptides were mixed in equal ratios for simultaneously PTM enrichment and analysis.

Enrichment of Phosphorylated Peptides and Formerly Sialylated Glycopeptides

Phosphopeptides and formerly sialylated glycopeptides enrichment was performed from the TMT labelled peptide mixture according to a previously published protocol [26]. The nonmodified peptide fraction was obtained from the flow-through of the TiO₂ enrichment and was dried under vacuum centrifugation. The eluted peptides from TiO₂ were resuspended in 50 mM TEAB (pH 7.5-8.0) and treated with PNGase F (New England BioLabs Inc., Massachusetts, USA) and Sialidase A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) overnight at 37 °C to remove N-linked sialic acid glycans [27]. After deglycosylation, the phospho/deglycosylated peptides and nonmodified peptides fractions were acidified (pH 1.5-2.0) with 100% trifluoroacetic acid (TFA) and desalted with a 1:1 mix of Poros™ 50 R2 and R3 reversed-phase resins (Thermo Scientific, USA) on a stage tip column. Samples were subjected to fractionation using high-pH reversed-phase (High-pH RP) to decrease the complexity, as published [28]. The phospho/deglycosylated peptides were separated into 12

concatenated fractions and the nonmodified peptides into 20 concatenated fractions, and subsequently dried by vacuum centrifugation.

Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis

All fractions were dissolved in buffer A (0.1% formic acid; FA) and loaded onto an EASY-nLC system (Thermo Scientific, Odense, Denmark) containing an in-house 20 cm fused silica capillary column (100 μm ID) packed with ReproSil-Pur C18 AQ 1.9 μm reversed-phase material (Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen, Germany). The peptides were eluted with the following chromatographic gradient (in percentage of solvent B): 1%–25% for 100 min; 25%–40% in 20 min; 40%–95% in 1 min; 95% for 5 min; 95%–1% in 1 min; and 1% for 5 min, with the flow at 300 nl/min using 132 min gradient. The nLC system was coupled to a Exploris 480 Mass Spectrometer (Thermo Scientific). The full MS scan was acquired in the mass range of 350–1200 m/z, resolution of 120,000 FWHM, a normalized AGC target value of 300%, and a maximum injection time in automatic mode. For each full scan, the top 10 most intense precursor ions were selected for higher energy collision dissociation (HCD) fragmentation with a normalized collision energy of 32. The MS/MS parameters were: resolution of 45,000 FWHM, normalized AGC target value of 300%, maximum injection time of 100 ms for the nonmodified fractions and 200 ms for the phospho/deglycosylated fractions, isolation window of 0.7 m/z, and a dynamic exclusion window of 20 s.

Bioinformatics analysis

The raw MS data sets were processed using the Proteome Discoverer (PD, v2.5, Thermo Scientific) and searched against the Swiss-Prot human database (20,594 entries, September 3rd, 2022) using an in-house MASCOT server (v2.8.2, Matrix Science Ltd, London, UK) and the Sequest HT algorithm. The database search was performed with the following parameters: peptide mass tolerance of 10 ppm; fragment m/z tolerance of 0.05 Da; enzyme set as trypsin allowing maximum 2 missed cleavages; dynamic modifications set as carbamidomethylation (cysteine), oxidation (methionine), and for the phospho/deglycosylated peptides the addition of phosphorylation (serine, threonine and tyrosine) and deamidation (asparagine); static

modifications set as TMT pro (lysine and N-term), and a false discovery rate (FDR) of 1% for proteins and peptides. Quantification and normalization of abundances was performed by the Reporter Ions Quantifier node of PD, with the General Quantification Settings mode for unique peptides, the Normalization at Total Peptide Amount mode and using all peptides for normalization and protein roll-up. The protein group from the nonmodified fractions was used for TP analysis while the peptide group was used for the SA glycoproteome and phosphoproteome analysis. The normalized abundances values of proteins with at least 2 unique peptides, and the SA glyco/phosphopeptides were log-transformed (\log_2) to achieve a normal distribution for subsequent analysis. Only glycosylated sites within the consensus sequence (N-X-S/T/C - where X is any amino acid except proline) were selected for further analysis. Phosphosite localization probability was checked in the MS/MS data sets using PhosphoRS [29] and only phosphosites with at least 99% probability were selected for further analysis.

The quantitative analysis was performed using the combined statistical testing tool PolySTest [30]. Significantly regulated peptides or proteins between groups were determined based on Limma test with adjusted p-value < 0.05 combined with a \log_2 Fold Change of 1 in each direction (positive or negative). Functional characterization of regulated proteins and modified peptides was carried at the R environment [31] and analyzed with the Clusterprofiler [32] and Enrichplot [33] packages for statistical analysis and plots. Clustered proteins or modified peptides were analyzed based on their gene names against the TP as background and biological processes were done based on over-representation analysis (ORA) [34] using Gene Ontology (GO) and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) annotations [35]. Kinase activity prediction was performed using the KinSwing package [36]. Statistical analyses were performed using the Benjamini-Hochberg method with p-value and q-value lower than 0.05 cut-off.

RESULTS

Overview and quality control of total proteome, phosphoproteome and SA glycoproteome

In general, were quantified 6232 proteins in the TP, 3413 proteins in the phosphoproteome, and 1052 proteins in the SA glycoproteome (Figure S1). Notably, only 2.3% was observed in common to the three studies. In the phosphoproteome, 10041 phosphosites with at least 99%

confidence were quantified, corresponding to 8834 phosphopeptides. For the SA glycoproteome, 2300 glycopeptides and glycosites were quantified. Thirty peptides presented concomitant phospho and glycosites (Table S2). This convergence highlights the complex interplay between phosphorylation and glycosylation in regulating cellular processes.

A hierarchical cluster analysis and a principal component analysis (PCA) were performed to evaluate possible samples differences in the TP and PTMome profile. Although the endometrium samples (control and endometriosis) and peritoneum samples (control and lesions) tended to cluster into two profiles in the PCA plots of our proteome, phosphoproteome, and SA glycoproteome datasets, it was not possible to establish a clear separation between the groups due to the samples' heterogeneity (figure S2A). Moreover, the overall expression profiles of samples from control and endometriosis patients showed no clear distinction for the TP, phosphoproteome, and SA glycoproteome (Figure S2B).

Differential regulation of total, phospho and SA glycoproteome and biological pathways in endometriosis

Several significantly regulated proteins/phosphopeptides/SA-glycopeptides were identified (adjusted p -value < 0.05; log₂ Fold Change of 1) between the main four comparisons (EExCE, ELxCE, ELxCP and ELxEE) (Table S2 and Figure S3). The ELxCE and the ELxCP presented a very low number of significant regulations in the TP (4 and 2 proteins, respectively) and phosphoproteome (5 and 0 peptides, respectively), with more differences in the SA-glycoproteome (207 and 14 peptides, respectively) (Figure S3). The EExCE comparison presented 20 proteins, 278 phosphopeptides and 300 SA-glycopeptides differentially regulated (Figure S4). ELxEE was the comparison with the highest number of significant regulations: 276 proteins in the TP, 2240 peptides in the phosphoproteome and 481 peptides in the SA glycoproteome (Figure S4).

Only the ELxEE comparison showed GO biological process (GO-BP) and KEGG pathway enrichments results for the up and downregulated proteins/modified peptides (Table S3). In the TP, actin cytoskeleton contraction, striated cell differentiation, positive regulation of cell-substrate adhesion and blood circulation were among the most significantly enriched GO-BP of upregulated proteins (Figure 1A). ECM-receptor interaction and focal adhesion were among

the KEGG most significant enriched pathways (Figure 1B). The downregulated proteins presented no enriched biological processes or KEEG pathways in the TP.

The most significant GO-BP enriched from the upregulated phosphopeptides were related to collagen adhesion and organization, muscle contraction and differentiation, and filament depolymerization (Figure 2A). The KEGG results for upregulated phosphopeptides were similar to those observed in the TP, with focal adhesion, ECM-receptor interaction and regulation of actin cytoskeleton enriched pathways (Figure 2B). Both GO-BP and KEGG analyses of downregulated phosphopeptides revealed enrichment focused on mRNA processing/spliceosome (Figure S5A and Table S3).

In the SA-glycoproteome, only the downregulated glycopeptides had significant enriched biological processes and pathways, most related to metabolic and glycosylation processes (Figure S5B and Table S3).

Regulation of focal adhesion and adherens junction-related proteins and peptides in endometriotic lesions

Considering the enrichment of focal adhesion and ECM-receptor interaction biological process and pathways in endometriotic lesions compared to the endometrium of endometriosis patients, we further evaluated the proteins, phosphopeptides and SA-glycopeptides related to it. Figure 3 provides a synthesis of the suggested proteins interactions in endometriotic lesions, along with their PTM regulations, while Tables 2 and 3 lists all the considered phosphorylation and SA-glycosylation sites. The main EMT markers (Figure 3A), including E-cadherin, N-cadherin, β -catenin, and p120-catenin, were all identified in the TP but with no change in their abundance when comparing EL and EE. In the phosphoproteome, E-cadherin and p120-catenin had regulated phosphorylation sites in endometriotic lesions. E-cadherin showed a downregulation of Thr748, located in the protein's juxtamembrane domain (JMD). p120-catenin, in turn, had seven different downregulated phosphosites: five in its regulatory domain (Ser268, Thr310, Ser346, Ser349, and Ser352), and two at the C-terminal tail (Thr916 and Ser920). No EMT transcription factors were identified in the TP, but the phosphopeptides of Zeb1 and 2 and Twist1 and 2 were detected. Twist2 presented four downregulated phosphosites in endometriotic lesions: two between the nuclear localization signals at the N-terminus (Ser40

and Ser44), and two between a nuclear localization signal and the basic helix-loop-helix (bHLH) domain (Ser55 and Ser60). None of the proteins cited above showed significant regulations in the SA glycoproteome.

Table 2: Phosphorylation of cell adhesion-related proteins in endometriotic lesions

Gene Symbol	Protein	Phosphosite	Regulated ELxEE	pValue
ACTN1	Alpha-actinin-1	S140	UP	0.005
		S1182	DOWN	0.007
AFDN	Afadin	S1721	DOWN	0.009
		S1779	DOWN	0.003
CDH1	Cadherin-1 (E-cadherin)	T748	DOWN	0.004
		S268	DOWN	0.011
		S349	DOWN	0.009
		S352	DOWN	0.003
CTNND1	Catenin delta-1	S920	DOWN	0.003
		T310	DOWN	0.008
		T916	DOWN	0.019

		S346; S349	DOWN	0.005
		S349; S352	DOWN	0.003
		S651	DOWN	0.010
<hr/>				
		S1734	UP	0.017
		S2180	UP	0.005
		S1470	UP	0.003
		S1533	UP	0.017
		S1630	UP	0.013
		S1946	UP	0.009
FLNA	Filamin-A	S2128	UP	0.004
		S2370	UP	0.003
		S2414	UP	0.017
		S2577	UP	0.005
		S310	UP	0.009
		S966	UP	0.006
<hr/>				

		S2152; S2163	UP	0.024
		Y442	UP	0.015
FN1	Fibronectin	S2475	UP	0.001
		T524	UP	0.007
IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	S1443	DOWN	0.009
ITGA4	Integrin alpha-4	S1021	DOWN	0.010
LAMB1	Laminin subunit beta-1	S1222	DOWN	0.009
LMO7	LIM domain only protein 7	S1423	DOWN	0.014
MYL9	Myosin regulatory light polypeptide 9	T19	UP	0.049
		S1438	UP	0.019
		S1773	UP	0.010
MYLK	Myosin light chain kinase, smooth muscle	S1848	UP	0.007
		S1776; S1779	UP	0.021
		S1776	UP	0.012
PPP1R12B	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B	S839	UP	0.025

		S242	UP	0.016
		S556	UP	0.003
		S412	UP	0.002
		S350	UP	0.004
		T1223	UP	0.008
		T497	UP	0.017
		S465; S472	UP	0.007
SORBS1	Sorbin and SH3 domain-containing protein 1	S704; S707	UP	0.013
		S85; S89	UP	0.042
		T237; S242	UP	0.009
		S454	UP	0.022
		S700	UP	0.006
		S451; S454	UP	0.011
		S696; S700	UP	0.039
		S115	UP	0.020

		S945	UP	0.007
SPP1	Osteopontin	S234	DOWN	0.020
		S254	DOWN	0.017
		S55; S60	DOWN	0.012
TWIST2	Twist-related protein 2	S40	DOWN	0.022
		S44	DOWN	0.008
		S290	UP	0.014
VCL	Vinculin	S456	UP	0.003
		S579	UP	0.010
		S721	UP	0.018
		S275	UP	0.003
		S357	UP	0.004
		S787	UP	0.002
		S346	UP	0.004

Table 3: Sialic acid glycosylation of cell adhesion-related proteins in endometriotic lesions

Gene Symbol	Protein	Glycosites	Regulated ELxEE	pValue
FN1	Fibronectin	N542	UP	0.003
		N1291	UP	0.016
VWF	von Willebrand factor	N2546	UP	0.002
		N2357	UP	0.019
		N2636	UP	0.010
		N2290	UP	0.019
LAMA4	Laminin subunit alpha-4	N787	UP	0.036
LAMB2	Laminin subunit beta-2	N1348	UP	0.007
LAMB1	Laminin subunit beta-1	N1542	DOWN	0.037
		N2038	DOWN	0.027
LAMA1	Laminin subunit alpha-1	N1991	DOWN	0.023
		N1717	DOWN	0.023
LAMC3	Laminin subunit gamma-3	N329	DOWN	0.004
		N631	DOWN	0.008

		N1025	UP	0.002
ITGA7	Integrin alpha-7	N989	UP	0.002
		N1045	UP	0.001
ITGA5	Integrin alpha-5	N182	UP	0.028
		N594	UP	0.045
ITGA11	Integrin alpha-11	N331	UP	0.028
		N449	UP	0.045
ITGA2	Integrin alpha-2	N1074	DOWN	0.014
ITGA6	Integrin alpha-6	N930	DOWN	0.009
ITGB6	Integrin beta-6	N463	DOWN	0.000
ITGB8	Integrin beta-8	N466	DOWN	0.022

Several ECM proteins and integrins were identified in the analyzed TP and PTMome, with most regulations presented in the phosphoproteome and SA-glycoproteome (Figure 3B). Additionally, actin-binding proteins such as filamin-A, α -actinin 1, and vinculin presented upregulated phosphosites in endometriotic lesions. The possible influence of the identified regulations in cell adhesion is summarized in Figure 3C.

Considering the kinase regulation of the phosphosites found in our analysis, the KinSwing results demonstrated that kinases in the ELxEE comparison presented no alteration or had a predicted lower activity (Figure S6 and Table S4), including kinases usually associated with

the regulation of EMT, focal adhesion, and adherens junction such as casein kinase II subunit alpha (CKIIA1) and Src protein-tyrosine kinase (SRC) (Figure 3A).

DISCUSSION

One potential mechanism of endometriosis progression is the dysfunction of cell adhesion molecules and pathways. These molecules play a crucial role in the attachment of cells to each other and the extracellular matrix, and their dysfunction can lead to the detachment and migration of cells. Our work is the first to present a quantitative proteomic profile of EMT markers involved in adherens junction and focal adhesion, as well as changes in the phosphorylation and sialic acid N-glycosylation profile of those markers, in endometriotic peritoneal lesions.

Considering the overall expression profile of our samples, there were no major differences between the control and endometriosis patients for both endometrium and peritoneal fragments (Supplemental figure S2). We observed heterogeneity within the groups, but analyzing only peritoneal samples provided a great advantage in reducing interference from the surrounding tissue. Since microdissection of the endometriotic lesions was not possible with enough quality for proteomic analysis, choosing lesions from a simpler structure (compared to bowel or bladder) allowed us to focus on the possible differences that the lesions would present. We still face the challenges of conducting a multi-tissue analysis. Still, our results already present an interesting perspective over the changes in TP, phosphoproteome and SA glycoproteome in endometriotic lesions.

We observed many regulations between the four groups (Supplemental figures S3 and S4), with the most significant changes observed when comparing the endometriotic lesions with the endometrium of the same patients (ELxEE). Analyzing the upset plots, we observed little overlap of the proteins, phosphosites and SA glycosites regulated in the ELxEE and the ones found in the other three comparisons. The fact that the ELxEE is an inpatient analysis potentially reduces the heterogeneity observed in the groups, and considering the aims of our work, the enriched pathways resulting from this comparison provide a clearer path to further investigate our interest targets.

Looking more carefully into the ELxEE comparison, we observed more significant regulations in the phosphoproteome and SA glycoproteome of our EMT interest markers. E-cadherin, a principal component of adherens junction complex, exhibited similar protein abundance between the two groups. However, we observed a downregulation of Thr748 phosphosite in the juxtamembrane domain (JMD) of the protein. While there is no specific description of the impacts of alterations in this particular phosphosite, phosphorylation of E-cadherin at Tyr754-755-756 by Src reduces its affinity for β -catenin [37,38] and p120-catenin [39,40], favoring E-cadherin binding to ubiquitinase Hakai and its consequent endocytosis. Therefore, the downregulation of phosphorylations at the E-cadherin JMD would maintain the integrity of the cadherin-catenin complex and, consequently, the adherens junction in endometriotic lesions.

The stability of adherens junctions could also be enhanced by decreased phosphorylation levels of three identified sites in p120-catenin: Ser268, Thr310 and Thr916. One of the key functions of p120-catenin is to stabilize the adhesive properties of E-cadherin by binding to the JMD and linking E-cadherin to the actin cytoskeleton [40]. p120-catenin binds to the JMD through its Armadillo domain (ARM), and the downregulated phosphosites identified in our data are located in the regulatory domains of the protein surrounding the ARM region [41]. Experimental evidence has demonstrated that the introduction of a p120-catenin Ser/Thr phosphorylation dead mutant (Ser252, Ser268, Ser288, Thr310, Ser312, and Thr916) induces enhanced cell adhesion mediated by E-cadherin in breast cancer cells [42], highlighting the importance of these surrounding phosphosites to the regulation of JMD-ARM binding. The downregulation of the detected phosphorylation sites in both p120-catenin and E-cadherin suggests an enhancement in the binding affinity between these proteins. This could potentially lead to increased cell-cell adhesion in the analyzed endometriotic lesions.

We identified the EMT transcription factors Zeb1, Zeb2, Twist 1 and Twist 2 only in the phosphoproteome, highlighting their dynamic nature and the importance of phosphorylation in modulating this biological process. Among them, Twist 2 exhibited downregulation in four phosphosites in endometriotic lesions, including Ser40, which is being described here for the first time. Currently, there is no data on how these four phosphosites might impact Twist 2 activity or its cell localization, and limited information is available about how PTMs regulate this transcription factor. Zeng and collaborators showed that SUMOylation of Lys129 stabilizes Twist 2 and promotes EMT [43], but there is no functional description of the phosphorylation

impacts on Twist 2. Considering the genetic sequence and functional similarities between Twist1 and Twist 2, it is possible that PTMs in Twist 1 could explain how phosphorylation affects Twist 2 [44]. The phosphorylation of Twist 1 at Ser68, the closest region of the identified phosphosites in Twist 2 in our data, stabilizes its structure and promotes invasion and metastasis in cancer [45], while dephosphorylation of pSer68 accelerates Twist 1 degradation [46]. Therefore, it is possible that the downregulation of Twist 2 phosphosites in the analyzed endometriotic lesions could decrease its transcriptional activity and, consequently, reduce EMT activation. However, further functional assays are necessary to validate the effects of modifying these specific phosphosites in Twist 2.

The regulation of cell adhesion by the cadherin-catenin complex occurs by connecting cadherins on neighboring cells to the actin cytoskeleton via other actin-binding proteins. This complex ensures the integrity of tissues and allows for the transmission of mechanical forces and signaling events between cells [47,48]. The interaction between the cadherin-catenin complex and the actin cytoskeleton is dynamic and regulated by PTMs, influencing the strength and stability of cell-cell adhesion. These modifications can lead to the reorganization of the actin cytoskeleton, resulting in changes in cell shape, migration, and tissue morphogenesis [49,50]. Even though endometriotic lesions presented no change in actin protein abundance or PTMs, actin anchoring and cross-linking proteins such as vinculin, α -actinin and filamin A displayed upregulated phosphosites.

Vinculin is a cytoskeletal protein involved in both cell-cell and cell-matrix junctions, playing a role in anchoring F-actin to the membrane. Available data indicates that vinculin undergoes distinct regulation depending on the specific phosphorylation site. Vinculin phosphorylation at Tyr822 is required for E-cadherin-dependent force transmission and signaling within cell-cell contacts [51]. Also, phosphorylation of Tyr100/Tyr1065 favors vinculin open/active conformation, and is required for normal tension generation during contractile stimulation in airway smooth muscle [52,53]. In the analyzed endometriotic lesions, all eight upregulated phosphosites were at serine residues (Ser290, Ser456, Ser579, Ser721, Ser275, Ser357, Ser787, Ser346). Although tyrosine phosphorylation appears to activate vinculin, the limited available data on serine phosphorylation suggests that phosphorylation at Ser721 induces a conformational change in vinculin towards a closed form, weakening its interaction with VE-cadherin [54]. Despite no data is currently available for the other identified serine phosphosites,

it is plausible that the upregulation of pSer721 in endometriotic lesions may disrupt the interaction between the cadherin-catenin complex and the actin cytoskeleton. However, additional functional analysis is required to validate this hypothesis.

Another protein that links adhesion proteins to the cytoskeleton is the α -actinin, which binds actin to adherens junctions via cadherins and focal adhesions via integrins complexes, establishing and reinforcing adhesion structures [55]. Limited available data on the protein phosphorylation indicates that pTyr12 decreases α -actinin1-actin binding in focal adhesions, possibly regulating focal adhesion maturation and turnover [56–58]. In our findings, we observed an increased phosphorylation at Ser140, a residue located in the actin-binding region of α -actinin 1, within endometriotic lesions. This modification may disrupt the binding domain and reduce the α -actinin1-actin affinity, impairing cell adhesion.

Afadin, LIM domain only protein 7 (LMO7) and sorbin1 are proteins that also interact with and compose the actin cytoskeleton. Their role in cell adhesion is complex and not yet fully understood, but they have been described to interact directly with actin, vinculin and α -actinin [59–61]. Both afadin and LMO7 presented down regulated phosphosites in the endometriotic lesions, which might lead to decreased cell migration and increased cell adhesion [62], as well as an increase in ECM deposition and fibrosis [63]. Conversely, endometriotic lesions showed higher protein abundance and upregulation of sorbin1 phosphorylation. However, the data about the pro or anti-metastatic role of sorbin1 is still conflicting [64,65].

Filamin A is a member of the actin-binding filamin protein family involved in actin cross-linking and can regulate cell motility and invasion through its interaction with transmembrane complexes, especially the integrins in focal adhesions [66]. Current data shows that Akt phosphorylation of filamin A at Ser2152 has a great impact on cell migration in cancer cells by both interacting with smad2, promoting its phosphorylation/activation of EMT and also mediating the effects of caveolin-1 on IGF-I-induced cell migration [66–69]. We identified 15 upregulated filamin A phosphosites in our analyzed endometriotic lesions, including the Ser2152. However, further analysis is required to evaluate the impact of this phosphorylation in altering endometriosis EMT activation via smad2 and cell motility.

In addition to the proteins that directly bind to actin, other intermediates that regulate the cytoskeleton also presented regulations in the analyzed endometriotic lesions. IQGAP1, the IQ

motif-containing GTPase-activating protein 1, plays crucial roles in governing cytoskeletal architecture, cell-cell adhesion, cellular polarization, and migration. The interaction between IQGAP1 and Rac1/CDC42 inhibits the association of IQGAP1 with β -catenin, resulting in increased levels of membrane-bound β -catenin. This, in turn, enhances cell-cell adhesion and promotes the formation of stable F-actin cross-links [70,71]. This IQGAP1-Rac1/CDC42 interaction is repressed by two phosphorylations at Ser1441 and Ser1443 in IQGAP1, disrupting the cell-cell adhesion complex interaction with F-actin [72–74]. In our data, endometriotic lesions presented a downregulation of phosphorylation at Ser1443, which may result in an augmented Rac1 binding affinity, enhancing cell-cell adhesion.

Another complex related to the cell adhesion-actin cytoskeleton regulation is the MYLK-MYL9-PPP1R12B. MYLK (myosin light chain kinase) phosphorylates MYL9 (myosin light chain 9), which promotes actomyosin contractility, leading to the reorganization of the actin cytoskeleton and strengthening of cell adhesion [75–77]. This process is modulated by PPP1R12B (protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B), which acts as a regulatory subunit for protein phosphatase 1 (PP1), counteracting the phosphorylation of MYL9 and promoting actomyosin relaxation [78,79]. Therefore, the balanced interplay between MYLK, MYL9, and PPP1R12B allows for dynamic control of cell adhesion, ensuring proper cellular morphology, migration, and tissue integrity. In our data, endometriotic lesions presented higher protein abundance and upregulation of phosphorylation in both MYL9 (Thr19) and PPP1R12B (Ser839), as well as upregulation of five phosphosites in MYLK (Table 2). Phosphorylation of MYL9 at Thr19 is known to induce cell adhesion [80], while other phosphorylations in PPP1R12B (Thr646) inhibits its activity [81]. Shi et al. (2022) revealed that phosphorylation of MYLK at Ser343 enhances cell motility in ovarian cancer [82]. However, since the identified phosphosites in endometriotic lesions are located exclusively in the protein's C-terminal region, further validation is required to confirm the effects of these specific phosphosites. Taken together, we suggest that the regulations observed in endometriotic lesions involving the MYLK-MYL9-PPP1R12B complex could increase cell adhesion.

Many of the proteins cited above are involved not only in cell-cell adhesion but also in cell-matrix adhesion regulation, linking the actin cytoskeleton to the integrins-ECM complexes (focal adhesion). The interactions between integrins and ECM molecules are highly dynamic, involving a multitude of ligands, signaling pathways, and adaptor proteins. The modulation of

these interactions is regulated not only by phosphorylation, but also by glycosylation [83,84]. Indeed, our data reveals that endometriotic lesions presented many changes in SA N-linked glycosylation patterns for the integrins and ECM proteins (Figure 3B), which can have significant consequences for cell adhesion, wound healing and inflammation, events critical to endometriosis establishment. In the context of integrins, SA glycosylation can modulate their affinity for ECM components, such as fibronectin and collagen, influencing the strength and stability of cell adhesion. Alterations in integrin SA glycosylation patterns may disrupt the binding ability of integrins to their ligands, impairing the formation of focal adhesions and weakening cell-matrix interactions [85,86]. We identified both up and down regulations for different α and β integrins subunits in the analyzed endometriotic lesions. However, it is important to note that integrins function primarily as dimeric structures, and the association of α and β subunits allows the extracellular domain of integrins to bind to specific ECM ligands. Therefore, the current methodology imposes a limitation on analyzing the downstream impact of the described integrins SA glycosylation in endometriotic lesions. Still, this preliminary description provides a promising insight to future analysis.

Similarly, alterations in SA glycosylation and phosphorylation of ECM proteins can impact cell adhesion by altering their binding properties, affecting cell-substrate interactions and adhesive strength [85]. Laminins, as a major basement membrane component, are essential for establishing epithelial cell polarity in normal tissue homeostasis [87]. Previous research on the SA glycosylation of laminins focuses on microbial interactions [88–90], suggesting that this PTM is necessary for pathogen cell attachment and entry. Also, N-glycosylated laminin-332 reduces keratinocyte cell adhesion and migration *in vitro* [91]. Different laminin glycosite regulations were found in endometriotic lesions (Table 3). Still, the analysis of the true impact of PTMs in laminins is limited by the techniques employed in this study, considering laminins are heterogeneous trimeric glycoproteins [92].

In the analyzed endometriotic lesions, Fibronectin 1, an ECM component, exhibited increased protein abundance, and upregulation of two phosphosites and two SA glycosites. SA glycosylation affects fibronectin 1 interaction with other ECM proteins and the treatment with PNGase F reduced cell adhesion *in vitro* [93–95]. Also, upregulation of fibronectin 1 is associated with tumor metastasis, and its phosphorylation increases cell traction forces and cell

spreading [87,96,97]. Therefore, phosphorylation and SA glycosylation of fibronectin 1 may generate the mechanical and cell adhesion changes necessary for cell migration.

Another ECM associated with cell attachment is osteopontin, an acidic hydrophilic glycoprotein that acts as a cytokine signaling through cell adhesion molecules like integrin and CD44 [98,99]. Phosphorylation has a major impact in osteopontin binding to these receptors and in our data, we observed a decreased phosphorylation in two osteopontin phosphosites. Although the effects of osteopontin phosphorylation seems to be tissue-dependent, its dephosphorylation is associated with a decrease in integrin binding and cell adhesion [100–102].

Von Willebrand factor (VWF) is a large multimeric plasma glycoprotein that acts as a coagulation factor, binding platelets to collagen and other ECM proteins during normal homeostasis [103]. Due to the cyclical nature of tissue injury and subsequent repair that occurs in endometriosis [Recurrent Tissue Injury and Repair (ReTIAR)], alterations in VWF present an interesting target to better understand the disease, as Von Willebrand Disease has been associated with menorrhagia and severe recurrence of endometriomas [104,105]. Our data showed that endometriotic lesions exhibited elevated SA glycosylation at four specific residues (Table 3). This SA glycosylation pattern appears to hinder the clearance and proteolysis of VWF [106], suggesting that the SA glycosylation of VWF plays a role in sustaining the cyclic process of wound repair in endometriotic lesions.

The regulation of EMT and cell adhesion is complex, involving many proteins and transcription factors, making it a challenging process to investigate. However, by evaluating the TP and PTMome of endometriotic lesions, we gained valuable insights into the significance of PTMs in shaping the pathways governing the structure and functionality of both cell-cell and cell-matrix junctions. The presence of phosphorylation and SA glycosylation within the endometriotic lesions sometimes indicated contrasting regulation of cell adhesion, reinforcing the intricate balance to which these networks are subjected (Figure 3C).

Recent studies have discussed that endometriosis presents a “mixed” epithelial and mesenchymal phenotype due to the concomitant expression of both cell type markers [7]. Here, we observed that more than the expression of specific proteins, their PTM regulation may also contribute to the phenotypic fluctuation in endometriotic lesions. The maintenance of tissue

architecture is considered crucial to the establishment of endometriosis [107], and collective cell migration (CCM) has been proposed as a possible mechanism of invasion in endometriosis and adenomyosis [108–110]. In CCM, as the rear of the leader cell is involved in intercellular connections (adherens junctions), the front of the cell interacts either with the extracellular matrix or with stationary cells within the tissue (focal adhesion) [111]. Therefore, adherens junctions limit the positioning of focal adhesions to the front edge of the cell by suppressing their establishment in other cell areas [112]. In this context, the regulations identified in endometriotic lesions support the hypothesis of maintaining the stability of the adherens junctions. At the same time, focal adhesions play a more dynamic role in balancing the level of cell adhesion, which can either increase or decrease. However, further functional and histopathological analysis are needed to validate our findings.

To our current understanding, this study presents the first characterization of EMT markers and cell adhesion markers comparing the eutopic endometrium and endometriotic lesions, examining both the total proteome and PTMome abundance. Our findings highlight the significance of phosphorylation and SA glycosylation in preserving the integrity of adherens junctions and maintaining the balance of cell adhesion in endometriosis. Furthermore, we provide new insights for future research into the influence of PTMs on the regulation of EMT and collective migration to establish endometriosis.

Author Contributions

CPA, MNMB and HLDP conceptualized and designed the research. AFR, SCVA and AMCF were responsible for sample collection. CPA, FHSS, BAC and MNMB performed sample preparation. AN was responsible for High-pH RP pre-fractionation. CPA conducted LC-MS/MS instrumentation, bioinformatic and statistical analyses, supported by AN, MRL and MNMB. CPA interpreted the data and wrote the original draft. MRL provided resources for proteomic analyses and critically revised and edited the manuscript. FMR, EF, MNMB and HLDP critically revised and edited the manuscript. MRL, MNMB and HLDP supervised the study.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)/Brazil, Finance code 001, National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and The Minas Gerais Research Funding Foundation (FAPEMIG). Thanks to the medical and nurse teams at the Clinical Hospital “Samuel Libânio” and Hospital and Maternity Santa Paula for the support during sample collection. The VILLUM Center for Bioanalytical Sciences at the University of Southern Denmark is acknowledged for access to state-of-the-art Mass spectrometric instrumentation. Thanks to all members from Protein Research Group at University of Southern Denmark, in special Arkadiusz Nawrocki, Vibeke Jørgensen, Vladimir Gorshkov and Andrea Maria Lorentzen for training CPA and column/instruments support.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] K.T. Zondervan, C.M. Becker, S.A. Missmer, Endometriosis, *N. Engl. J. Med.* 382 (2020) 1244–1256. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1810764>.
- [2] Y. Hao, D. Baker, P. Ten Dijke, TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/IJMS20112767>.
- [3] S. Lamouille, J. Xu, R. Derynck, Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>.
- [4] W. Xiong, L. Zhang, H. Liu, N. Li, Y. Du, H. He, Z. Zhang, Y. Liu, E2-mediated EMT by activation of β -catenin/Snail signalling during the development of ovarian endometriosis, *J. Cell. Mol. Med.* 23 (2019) 8035–8045.

- <https://doi.org/10.1111/jcmm.14668>.
- [5] R. Gaetje, S. Kotzian, G. Herrmann, R. Baumann, A. Starzinski-Powitz, Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin., *Am. J. Pathol.* 150 (1997) 461–7. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(88\)80043-8](https://doi.org/10.1016/0731-7085(88)80043-8).
- [6] E.M. Grund, D. Kagan, C.A. Tran, A. Zeitvogel, A. Starzinski-Powitz, S. Nataraja, S.S. Palmer, Tumor Necrosis Factor- α Regulates Inflammatory and Mesenchymal Responses via Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase, p38, and Nuclear Factor κ B in Human Endometriotic Epithelial Cells, *Mol. Pharmacol.* 73 (2008) 1394–1404. <https://doi.org/10.1124/mol.107.042176>.
- [7] L. Konrad, R. Dietze, M.A. Riaz, G. Scheiner-Bobis, J. Behnke, F. Horné, A. Hoerscher, C. Reising, I. Meinhold-Heerlein, Epithelial–Mesenchymal Transition in Endometriosis—When Does It Happen?, *J. Clin. Med.* 9 (2020) 1915. <https://doi.org/10.3390/jcm9061915>.
- [8] S. Matsuzaki, C. Darcha, Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis†, *Hum. Reprod.* 27 (2012) 712–721. <https://doi.org/10.1093/humrep/der442>.
- [9] C. Poncelet, M. Leblanc, F. Walker-Combrouze, D. Soriano, G. Feldmann, P. Madelenat, J.Y. Scoazec, E. Daraï, Expression of cadherins and CD44 isoforms in human endometrium and peritoneal endometriosis, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 81 (2002) 195–203. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0412.2002.810302.x>.
- [10] L. Shapiro, W.I. Weis, Structure and Biochemistry of Cadherins and Catenins, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1 (2009) a003053. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A003053>.
- [11] K. Shah, J.U. Kazi, Phosphorylation-Dependent Regulation of WNT/Beta-Catenin Signaling, *Front. Oncol.* 12 (2022) 881. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.858782/BIBTEX>.

- [12] I. Lindberg, J.R. Peinado, Posttranslational Modifications: Key Players in Health and Disease, in: *Encycl. Cell Biol.*, Elsevier, 2016: pp. 84–90. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.10014-8>.
- [13] B.T. Jamal, M. Nita-Lazar, Z. Gao, B. Amin, J. Walker, M.A. Kukuruzinska, N-glycosylation status of E-cadherin controls cytoskeletal dynamics through the organization of distinct β -catenin- and γ -catenin-containing AJs, *Cell Health Cytoskelet.* Volume 1 (2009) 67–80. <https://doi.org/10.2147/chc.s5965>.
- [14] S. Carvalho, C.A. Reis, S.S. Pinho, Cadherins Glycans in Cancer: Sweet Players in a Bitter Process, *Trends in Cancer.* 2 (2016) 519–531. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.08.003>.
- [15] M. Yoshimura, Y. Ihara, Y. Matsuzawa, N. Taniguchi, Aberrant glycosylation of E-cadherin enhances cell-cell binding to suppress metastasis, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 13811–13815. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.23.13811>.
- [16] S.S. Pinho, R. Seruca, F. Gärtner, Y. Yamaguchi, J. Gu, N. Taniguchi, C.A. Reis, Modulation of E-cadherin function and dysfunction by N-glycosylation, *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011) 1011–1020. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0595-0>.
- [17] H. Zhao, Y. Liang, Z. Xu, L. Wang, F. Zhou, Z. Li, J. Jin, Y. Yang, Z. Fang, Y. Hu, L. Zhang, J. Su, X. Zha, N-Glycosylation affects the adhesive function of E-Cadherin through modifying the composition of adherens junctions (AJs) in human breast carcinoma cell line MDA-MB-435, *J. Cell. Biochem.* 104 (2008) 162–175. <https://doi.org/10.1002/JCB.21608>.
- [18] A.E. McEwen, M.T. Maher, R. Mo, C.J. Gottardi, E-cadherin phosphorylation occurs during its biosynthesis to promote its cell surface stability and adhesion, *Mol. Biol. Cell.* 25 (2014) 2365–2374. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-01-0690>.
- [19] H. Lickert, A. Bauer, R. Kemler, J. Stappert, Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 5090–5095. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.7.5090>.

- [20] J. Stappert, R. Kemler, A short core region of E-cadherin is essential for catenin binding and is highly phosphorylated, *Cell Adhes. Commun.* 2 (1994) 319–327. <https://doi.org/10.3109/15419069409014207>.
- [21] U.K. Soni, S.B. Chadchan, V. Kumar, V. Ubba, M.T.A. Khan, B.S.V. Vinod, R. Konwar, H.K. Bora, S.K. Rath, S. Sharma, R.K. Jha, A high level of TGF-B1 promotes endometriosis development via cell migration, adhesiveness, colonization, and invasiveness†, *Biol. Reprod.* 100 (2019) 917–938. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOY242>.
- [22] M. Canis, J.G. Donnez, D.S. Guzick, J.K. Halme, J.A. Rock, R.S. Schenken, M.W. Vernon, Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996, *Fertil. Steril.* 67 (1997) 817–821. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)81391-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)81391-X).
- [23] T. Kang, H. Huang, T. Mandrup-Poulsen, M.R. Larsen, Divalent metal transporter 1 knock-down modulates il-1 β mediated pancreatic beta-cell pro-apoptotic signaling pathways through the autophagic machinery, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms22158013>.
- [24] D. Wessel, U.I. Flügge, A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids, *Anal. Biochem.* 138 (1984) 141–143. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90782-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90782-6).
- [25] J. Erde, R.R.O. Loo, J.A. Loo, Enhanced FASP (eFASP) to Increase Proteome Coverage and Sample Recovery for Quantitative Proteomic Experiments, *J. Proteome Res.* 13 (2014) 1885–1895. <https://doi.org/10.1021/pr4010019>.
- [26] G. Palmisano, B.L. Parker, K. Engholm-Keller, S.E. Lendal, K. Kulej, M. Schulz, V. Schwämmle, M.E. Graham, H. Saxtorph, S.J. Cordwell, M.R. Larsen, A novel method for the simultaneous enrichment, identification, and quantification of phosphopeptides and sialylated glycopeptides applied to a temporal profile of mouse brain development, *Mol. Cell. Proteomics.* 11 (2012) 1191–1202. <https://doi.org/10.1074/MCP.M112.017509>.

- [27] M.R. Larsen, S.S. Jensen, L.A. Jakobsen, N.H.H. Heegaard, Exploring the sialome using titanium dioxide chromatography and mass spectrometry, *Mol. Cell. Proteomics*. 6 (2007) 1778–1787. <https://doi.org/10.1074/MCP.M700086-MCP200>.
- [28] I. Boll, P. Jensen, V. Schwämmle, M.R. Larsen, Depolarization-dependent Induction of Site-specific Changes in Sialylation on N-linked Glycoproteins in Rat Nerve Terminals, *Mol. Cell. Proteomics*. 19 (2020) 1418. <https://doi.org/10.1074/MCP.RA119.001896>.
- [29] T. Taus, T. Köcher, P. Pichler, C. Paschke, A. Schmidt, C. Henrich, K. Mechtler, Universal and confident phosphorylation site localization using phosphoRS, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 5354–5362. https://doi.org/10.1021/PR200611N/SUPPL_FILE/PR200611N_SI_006.XLS.
- [30] V. Schwämmle, C.E. Hagensen, A. Rogowska-Wrzesinska, O.N. Jensen, PolySTest: Robust statistical testing of proteomics data with missing values improves detection of biologically relevant features, *Mol. Cell. Proteomics*. 19 (2020) 1396–1408. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001777>.
- [31] Posit team, RStudio: Integrated Development Environment for R, (2022). <http://www.posit.co/>.
- [32] T. Wu, E. Hu, S. Xu, M. Chen, P. Guo, Z. Dai, T. Feng, L. Zhou, W. Tang, L. Zhan, X. Fu, S. Liu, X. Bo, G. Yu, clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data, *Innov.* 2 (2021) 100141. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100141>.
- [33] G. Yu, enrichplot: Visualization of Functional Enrichment Result, (2022). <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.enrichplot>.
- [34] E.I. Boyle, S. Weng, J. Gollub, H. Jin, D. Botstein, J.M. Cherry, G. Sherlock, GO::TermFinder—open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes, *Bioinformatics*. 20 (2004) 3710–3715. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTH456>.
- [35] D. Nam, S.Y. Kim, Gene-set approach for expression pattern analysis, *Brief. Bioinform.* 9 (2008) 189–197. <https://doi.org/10.1093/BIB/BBN001>.

- [36] K. Engholm-Keller, A.J. Waardenberg, J.A. Müller, J.R. Wark, R.N. Fernando, J.W. Arthur, P.J. Robinson, D. Dietrich, S. Schoch, M.E. Graham, The temporal profile of activity-dependent presynaptic phospho-signalling reveals longlasting patterns of poststimulus regulation, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000170>.
- [37] Y. Fujita, G. Krause, M. Scheffner, D. Zechner, H.E.M. Leddy, J. Behrens, T. Sommer, W. Birchmeier, Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 222–231. <https://doi.org/10.1038/NCB758>.
- [38] B. Catimel, M. Layton, N. Church, J. Ross, M. Condrón, M. Faux, R.J. Simpson, A.W. Burgess, E.C. Nice, In situ phosphorylation of immobilized receptors on biosensor surfaces: Application to E-cadherin/ β -catenin interactions, *Anal. Biochem.* 357 (2006) 277–288. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2006.07.034>.
- [39] M. Mukherjee, S.Y. Chow, P. Yusoff, J. Seetharaman, C. Ng, S. Sinniah, X.W. Koh, N.F.M. Asgar, D. Li, D. Yim, R.A. Jackson, J. Yew, J. Qian, A. Iyu, Y.P. Lim, X. Zhou, S.K. Sze, G.R. Guy, J. Sivaraman, Structure of a novel phosphotyrosine-binding domain in Hakai that targets E-cadherin, *EMBO J.* 31 (2012) 1308–1319. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2011.496>.
- [40] N. Ishiyama, S.H. Lee, S. Liu, G.Y. Li, M.J. Smith, L.F. Reichardt, M. Ikura, Dynamic and Static Interactions between p120 Catenin and E-Cadherin Regulate the Stability of Cell-Cell Adhesion, *Cell.* 141 (2010) 117–128. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.01.017>.
- [41] A.B. Reynolds, A. Rocznik-Ferguson, Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer, *Oncogene* 2004 2348. 23 (2004) 7947–7956. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208161>.
- [42] A.M. Mendonsa, C. Bandyopadhyay, B.M. Gumbiner, B.M. Gumbiner, B.M. Gumbiner, p120-catenin phosphorylation status alters E-cadherin mediated cell adhesion and ability of tumor cells to metastasize, *PLoS One.* 15 (2020). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0235337>.
- [43] W. Zeng, S. Gu, Y. Yu, Y. Feng, M. Xiao, X.-H. Feng, ZNF451 stabilizes TWIST2

- through SUMOylation and promotes epithelial-mesenchymal transition, *Am. J. Cancer Res.* 11 (2021) 898. /pmc/articles/PMC7994150/ (accessed June 14, 2023).
- [44] H.L. Franco, J. Casasnovas, J.R. Rodríguez-Medina, C.L. Cadilla, Redundant or separate entities?—roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene transcription, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 1177. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKQ890>.
- [45] N.Y. Li, C.E. Weber, P.Y. Wai, B.D. Cuevas, J. Zhang, P.C. Kuo, Z. Mi, An MAPK-dependent pathway induces epithelial-mesenchymal transition via Twist activation in human breast cancer cell lines, *Surgery.* 154 (2013) 404–410. <https://doi.org/10.1016/J.SURG.2013.05.012>.
- [46] T. Sun, J. Fu, T. Shen, X. Lin, L. Liao, X.H. Feng, J. Xu, The Small C-terminal Domain Phosphatase 1 Inhibits Cancer Cell Migration and Invasion by Dephosphorylating Ser(P)68-Twist1 to Accelerate Twist1 Protein Degradation, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 11518. <https://doi.org/10.1074/JBC.M116.721795>.
- [47] C.D. Buckley, J. Tan, K.L. Anderson, D. Hanein, N. Volkmann, W.I. Weis, W.J. Nelson, A.R. Dunn, Cell adhesion. The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force, *Science.* 346 (2014). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1254211>.
- [48] T.J.C. Harris, U. Tepass, Adherens junctions: from molecules to morphogenesis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010 117. 11 (2010) 502–514. <https://doi.org/10.1038/nrm2927>.
- [49] B. MacTaggart, A. Kashina, Posttranslational modifications of the cytoskeleton, *Cytoskeleton (Hoboken).* 78 (2021) 142–173. <https://doi.org/10.1002/CM.21679>.
- [50] S. Varland, J. Vandekerckhove, A. Drazic, Actin Post-translational Modifications: The Cinderella of Cytoskeletal Control, *Trends Biochem. Sci.* 44 (2019) 502–516. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2018.11.010>.
- [51] J.L. Bays, X. Peng, C.E. Tolbert, C. Guilluy, A.E. Angell, Y. Pan, R. Superfine, K. Burridge, K.A. DeMali, Vinculin phosphorylation differentially regulates mechanotransduction at cell–cell and cell–matrix adhesions, *J. Cell Biol.* 205 (2014) 251. <https://doi.org/10.1083/JCB.201309092>.

- [52] Y. Huang, R.N. Day, S.J. Gunst, Vinculin Phosphorylation at Tyr1065 Regulates Vinculin Conformation and Tension Development in Airway Smooth Muscle Tissues, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 3677–3688. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.508077>.
- [53] J. Golji, T. Wendorff, M.R.K. Mofrad, Phosphorylation primes vinculin for activation, *Biophys. J.* 102 (2012) 2022–2030. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2012.01.062>.
- [54] Y.-T. Shih, S.-Y. Wei, J.-H. Chen, W.-L. Wang, H.-Y. Wu, M.-C. Wang, C.-Y. Lin, P.-L. Lee, C.-Y. Lin, H.-C. Chiang, Y.-J. Chen, S. Chien, J.-J. Chiu, Vinculin phosphorylation impairs vascular endothelial junctions promoting atherosclerosis, *Eur. Heart J.* 44 (2023) 304–318. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac647>.
- [55] Y. Feng, H. Ngu, S.K. Alford, M. Ward, F. Yin, G.D. Longmore, α -Actinin1 and 4 tyrosine phosphorylation is critical for stress fiber establishment, maintenance and focal adhesion maturation, *Exp. Cell Res.* 319 (2013) 1124. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2013.02.009>.
- [56] G. Izaguirre, L. Aguirre, Y.P. Hu, H.Y. Lee, D.D. Schlaepfer, B.J. Aneskievich, B. Haimovich, The cytoskeletal/non-muscle isoform of alpha-actinin is phosphorylated on its actin-binding domain by the focal adhesion kinase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 28676–28685. <https://doi.org/10.1074/JBC.M101678200>.
- [57] G. Von Wichert, B. Haimovich, G.S. Feng, M.P. Sheetz, Force-dependent integrin-cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by Shp2, *EMBO J.* 22 (2003) 5023–5035. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG492>.
- [58] D.H. Craig, B. Haimovich, M.D. Basson, Alpha-actinin-1 phosphorylation modulates pressure-induced colon cancer cell adhesion through regulation of focal adhesion kinase-Src interaction, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293 (2007). <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00118.2007>.
- [59] T. Svitkina, *The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility*, Cold Spring Harb. *Perspect. Biol.* 10 (2018). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018267>.
- [60] T. Ooshio, K. Irie, K. Morimoto, A. Fukuhara, T. Imai, Y. Takai, Involvement of LMO7 in the association of two cell-cell adhesion molecules, nectin and E-cadherin, through

- afadin and alpha-actinin in epithelial cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 31365–31373. <https://doi.org/10.1074/JBC.M401957200>.
- [61] K.A. Badu-Nkansah, T. Lechler, Proteomic analysis of desmosomes reveals novel components required for epidermal integrity, *Mol. Biol. Cell.* 31 (2020) 1140–1153. <https://doi.org/10.1091/MBC.E19-09-0542/ASSET/IMAGES/LARGE/MBC-31-1140-G006.JPEG>.
- [62] S. Elloul, D. Kedrin, N.W. Knoblauch, A.H. Beck, A. Toker, The adherens junction protein afadin is an AKT substrate that regulates breast cancer cell migration, *Mol. Cancer Res.* 12 (2014) 464–476. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0398>.
- [63] Y. Xie, A.C. Ostriker, Y. Jin, H. Hu, A.J. Sizer, G. Peng, A.H. Morris, C. Ryu, E.L. Herzog, T. Kyriakides, H. Zhao, A. Dardik, J. Yu, J. Hwa, K.A. Martin, LMO7 Is a Negative Feedback Regulator of Transforming Growth Factor β Signaling and Fibrosis, *Circulation*. 139 (2019) 679–693. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034615>.
- [64] W.C. Cho, J.E. Jang, K.H. Kim, B.C. Yoo, J.L. Ku, SORBS1 serves a metastatic role via suppression of AHNAK in colorectal cancer cell lines, *Int. J. Oncol.* 56 (2020) 1140. <https://doi.org/10.3892/IJO.2020.5006>.
- [65] L. Song, R. Chang, C. Dai, Y. Wu, J. Guo, M. Qi, W. Zhou, L. Zhan, SORBS1 suppresses tumor metastasis and improves the sensitivity of cancer to chemotherapy drug, *Oncotarget*. 8 (2017) 9108. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.12851>.
- [66] M. Cheng, Y. Jiang, H. Yang, D. Zhao, L. Li, X. Liu, FLNA promotes chemoresistance of colorectal cancer through inducing epithelial-mesenchymal transition and smad2 signaling pathway., *Am. J. Cancer Res.* 10 (2020) 403–423. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7061762/pdf/ajcr0010-0403.pdf> (accessed June 26, 2023).
- [67] Z. Zhong, W.S. Yeow, C. Zou, R. Wassell, C. Wang, R.G. Pestell, J.N. Quong, A.A. Quong, Cyclin D1/cyclin dependent kinase 4 interacts with filamin A and affects the migration and invasion potential of breast cancer cells, *Cancer Res.* 70 (2010) 2105.

- <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1108>.
- [68] D. Ravid, D. Chuderland, L. Landsman, Y. Lavie, R. Reich, M. Liscovitch, Filamin A is a novel caveolin-1-dependent target in IGF-I-stimulated cancer cell migration, *Exp. Cell Res.* 314 (2008) 2762–2773. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2008.06.004>.
- [69] L. Li, Y. Lu, P.M. Stemmer, F. Chen, Filamin A phosphorylation by Akt promotes cell migration in response to arsenic, *Oncotarget.* 6 (2015) 12009–12019. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.3617>.
- [70] J. Noritake, T. Watanabe, K. Sato, S. Wang, K. Kaibuchi, IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 2085–2092. <https://doi.org/10.1242/JCS.02379>.
- [71] J.M. Smith, A.C. Hedman, D.B. Sacks, IQGAPs choreograph cellular signaling from the membrane to the nucleus, *Trends Cell Biol.* 25 (2015) 171. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2014.12.005>.
- [72] K.S. Carmon, X. Gong, J. Yi, L. Wu, A. Thomas, C.M. Moore, I. Masuho, D.J. Timson, K.A. Martemyanov, Q.J. Liu, LGR5 receptor promotes cell–cell adhesion in stem cells and colon cancer cells via the IQGAP1–Rac1 pathway, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 14989. <https://doi.org/10.1074/JBC.M117.786798>.
- [73] S.F. Elliott, G. Allen, D.J. Timson, Biochemical analysis of the interactions of IQGAP1 C-terminal domain with CDC42, *World J. Biol. Chem.* 3 (2012) 53. <https://doi.org/10.4331/WJBC.V3.I3.53>.
- [74] K. Nouri, E.K. Fansa, E. Amin, R. Dvorsky, L. Gremer, D. Willbold, L. Schmitt, D.J. Timson, M.R. Ahmadian, IQGAP1 Interaction with RHO Family Proteins Revisited: KINETIC AND EQUILIBRIUM EVIDENCE FOR MULTIPLE DISTINCT BINDING SITES*, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 26364. <https://doi.org/10.1074/JBC.M116.752121>.
- [75] K.E. Kamm, J.T. Stull, Dedicated Myosin Light Chain Kinases with Diverse Cellular Functions*, *J. Biol. Chem.* 276 (2000) 4527–4530. <https://doi.org/10.1074/jbc.R000028200>.

- [76] A.P. Somlyo, A. V. Somlyo, Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 1325–1358.
<https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00023.2003/ASSET/IMAGES/LARGE/9J0430273006.JPEG>.
- [77] X. Tan, M. Chen, MYLK and MYL9 expression in non-small cell lung cancer identified by bioinformatics analysis of public expression data, *Tumor Biol.* 35 (2014) 12189–12200. <https://doi.org/10.1007/S13277-014-2527-3/FIGURES/5>.
- [78] J. Tan, T. Lu, J. Xu, Y. Hou, Z. Chen, K. Zhou, Y. Ding, B. Jiang, Y. Zhu, MicroRNA-4463 facilitates the development of colon cancer by suppression of the expression of PPP1R12B, *Clin. Transl. Oncol.* 24 (2022) 1115–1123. <https://doi.org/10.1007/S12094-021-02752-0>.
- [79] R. Okamoto, T. Kato, A. Mizoguchi, N. Takahashi, T. Nakakuki, H. Mizutani, N. Isaka, K. Imanaka-Yoshida, K. Kaibuchi, Z. Lu, K. Mabuchi, T. Tao, D.J. Hartshorne, T. Nakano, M. Ito, Characterization and function of MYPT2, a target subunit of myosin phosphatase in heart, *Cell. Signal.* 18 (2006) 1408–1416.
<https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2005.11.001>.
- [80] K.A. Newell-Litwa, M. Badoual, H. Asmussen, H. Patel, L. Whitmore, A.R. Horwitz, ROCK1 and 2 differentially regulate actomyosin organization to drive cell and synaptic polarity, *J. Cell Biol.* 210 (2015) 225–242. <https://doi.org/10.1083/JCB.201504046>.
- [81] K. Pham, P. Langlais, X. Zhang, A. Chao, M. Zingsheim, Z. Yi, Insulin-stimulated phosphorylation of protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B revealed by HPLC-ESI-MS/MS, *Proteome Sci.* 10 (2012) 52. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-10-52>.
- [82] X. Shi, X. Yu, J. Wang, S. Bian, Q. Li, F. Fu, X. Zou, L. Zhang, R.C. Bast, Z. Lu, L. Guo, Y. Chen, J. Zhou, SIK2 promotes ovarian cancer cell motility and metastasis by phosphorylating MYLK, *Mol. Oncol.* 16 (2022) 2558–2574.
<https://doi.org/10.1002/1878-0261.13208>.
- [83] S.S. Pinho, C.A. Reis, Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications,

- Nat. Rev. Cancer 2015 159. 15 (2015) 540–555. <https://doi.org/10.1038/nrc3982>.
- [84] C.Y. Su, J.Q. Li, L.L. Zhang, H. Wang, F.H. Wang, Y.W. Tao, Y.Q. Wang, Q.R. Guo, J.J. Li, Y. Liu, Y.Y. Yan, J.Y. Zhang, The Biological Functions and Clinical Applications of Integrins in Cancers, *Front. Pharmacol.* 11 (2020) 579068. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.579068/BIBTEX>.
- [85] C. Dobie, D. Skropeta, Insights into the role of sialylation in cancer progression and metastasis, *Br. J. Cancer* 2020 1241. 124 (2020) 76–90. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01126-7>.
- [86] O. Suzuki, M. Abe, Y. Hashimoto, Sialylation and glycosylation modulate cell adhesion and invasion to extracellular matrix in human malignant lymphoma: Dependency on integrin and the Rho GTPase family, *Int. J. Oncol.* 47 (2015) 2091–2099. <https://doi.org/10.3892/IJO.2015.3211/HTML>.
- [87] J. Winkler, A. Abisoye-Ogunniyan, K.J. Metcalf, Z. Werb, Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis, *Nat. Commun.* 2020 111. 11 (2020) 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18794-x>.
- [88] T. Ferreira, A. Kulkarni, C. Bretscher, P. Nazarov, J. Hossain, L. Ystaas, H. Miletic, R. Röth, B. Niesler, A. Marchini, Oncolytic H-1 Parvovirus Hijacks Galectin-1 to Enter Cancer Cells, *Viruses*. 14 (2022) 1018. <https://doi.org/10.3390/v14051018>.
- [89] A. Kulkarni, T. Ferreira, C. Bretscher, A. Grewenig, N. El-Andaloussi, S. Bonifati, T. Marttila, V. Palissot, J.A. Hossain, F. Azuaje, H. Miletic, L.A.R. Ystaas, A. Golebiewska, S.P. Niclou, R. Roeth, B. Niesler, A. Weiss, L. Brino, A. Marchini, Oncolytic H-1 parvovirus binds to sialic acid on laminins for cell attachment and entry, *Nat. Commun.* 12 (2021) 3834. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24034-7>.
- [90] C.R. Williams, L. Chen, E.S. Sheppard, P. Chopra, J. Locklin, G.-J. Boons, D.C. Krause, Distinct *Mycoplasma pneumoniae* Interactions with Sulfated and Sialylated Receptors, *Infect. Immun.* 88 (2020). <https://doi.org/10.1128/IAI.00392-20>.
- [91] Y. Kariya, R. Kato, S. Itoh, T. Fukuda, Y. Shibukawa, N. Sanzen, K. Sekiguchi, Y. Wada, N. Kawasaki, J. Gu, N-Glycosylation of Laminin-332 Regulates Its Biological

- Functions, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 33036–33045. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804526200>.
- [92] E. Hohenester, Structural biology of laminins, *Essays Biochem.* 63 (2019) 285–295. <https://doi.org/10.1042/EBC20180075>.
- [93] C.-T. Hsiao, H.-W. Cheng, C.-M. Huang, H.-R. Li, M.-H. Ou, J.-R. Huang, K.-H. Khoo, H.W. Yu, Y.-Q. Chen, Y.-K. Wang, A. Chiou, J.-C. Kuo, C.-T. Hsiao, H.-W. Cheng, C.-M. Huang, H.-R. Li, M.-H. Ou, J.-R. Huang, K.-H. Khoo, H. Wenshin Yu, Y.-Q. Chen, Y.-K. Wang, A. Chiou, J.-C. Kuo, Fibronectin in cell adhesion and migration via N-glycosylation, *Oncotarget.* 8 (2017) 70653–70668. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.19969>.
- [94] D. Liu, S. Wang, J. Zhang, W. Xiao, C.H. Miao, B.A. Konkle, X.-F. Wan, L. Li, Site-Specific N- and O-Glycosylation Analysis of Human Plasma Fibronectin, *Front. Chem.* 9 (2021) 691217. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2021.691217>.
- [95] S.T. Teoh, M.P. Ogradzinski, C. Ross, K.W. Hunter, S.Y. Lunt, Sialic Acid Metabolism: A Key Player in Breast Cancer Metastasis Revealed by Metabolomics, *Front. Oncol.* 8 (2018). <https://doi.org/10.3389/FONC.2018.00174>.
- [96] G. Yalak, J.Y. Shiu, I. Schoen, M. Mitsi, V. Vogel, Phosphorylated fibronectin enhances cell attachment and upregulates mechanical cell functions, *PLoS One.* 14 (2019). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0218893>.
- [97] G. Efthymiou, A. Saint, M. Ruff, Z. Rekad, D. Ciais, E. Van Obberghen-Schilling, Shaping Up the Tumor Microenvironment With Cellular Fibronectin, *Front. Oncol.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00641>.
- [98] M. Singh, C.R. Foster, S. Dalal, K. Singh, Osteopontin: role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling post-MI, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48 (2010) 538. <https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2009.06.015>.
- [99] C.C. Kazanecki, D.J. Uzwiak, D.T. Denhardt, Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding, *J. Cell. Biochem.* 102 (2007) 912–924. <https://doi.org/10.1002/JCB.21558>.

- [100] B. Christensen, C.C. Kazanecki, T.E. Petersen, S.R. Rittling, D.T. Denhardt, E.S. Sørensen, Cell type-specific post-translational modifications of mouse osteopontin are associated with different adhesive properties, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 19463–19472. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703055200>.
- [101] Y. Katayama, C.M. House, N. Udagawa, J.J. Kazama, R.J. McFarland, T.J. Martin, D.M. Findlay, Casein kinase 2 phosphorylation of recombinant rat osteopontin enhances adhesion of osteoclasts but not osteoblasts, *J. Cell. Physiol.* 176 (1998) 179–187. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199807\)176:1<179::AID-JCP19>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199807)176:1<179::AID-JCP19>3.0.CO;2-2).
- [102] R. Al-Shami, E.S. Sorensen, B. Ek-Rylander, G. Andersson, D.D. Carson, M.C. Farach-Carson, Phosphorylated osteopontin promotes migration of human choriocarcinoma cells via a p70 S6 kinase-dependent pathway, *J. Cell. Biochem.* 94 (2005) 1218–1233. <https://doi.org/10.1002/jcb.20379>.
- [103] D.A. Keesler, C.E. Kochelek, T.L. Slobodianuk, R.R. Montgomery, V.H. Flood, Critical Extracellular Matrix Proteins Besides Collagen Bind Von Willebrand Factor, *Blood*. 130 (2017) 2309–2309. https://doi.org/10.1182/BLOOD.V130.SUPPL_1.2309.2309.
- [104] F. Rizzello, E. Ralli, C. Romanelli, M.E. Coccia, Severe recurrent endometriomas in a young woman with congenital von Willebrand disease, <https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1641481>. 35 (2019) 1040–1042. <https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1641481>.
- [105] U. Agarwal, S. El Sheikh, A. Kulkarni, D. Baff, R.A. Kadir, Von Willebrand factor expression in endometrial endothelial cells in women with menorrhagia, *Fertil. Steril.* 94 (2010) 2335–2337. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2010.02.055>.
- [106] S. Ward, J.M. O’Sullivan, J.S. O’Donnell, von Willebrand factor sialylation-A critical regulator of biological function, *J. Thromb. Haemost.* 17 (2019) 1018–1029. <https://doi.org/10.1111/JTH.14471>.
- [107] A.W. Nap, P.G. Groothuis, A.Y. Demir, J.W.M. Maas, G.A.J. Dunselman, A.F.P.M. de Goeij, J.L.H. Evers, Tissue integrity is essential for ectopic implantation of human endometrium in the chicken chorioallantoic membrane, *Hum. Reprod.* 18 (2003) 30–34.

<https://doi.org/10.1093/humrep/deg033>.

- [108] J. García-Solares, M.M. Dolmans, J.L. Squifflet, J. Donnez, O. Donnez, Invasion of human deep nodular endometriotic lesions is associated with collective cell migration and nerve development, *Fertil. Steril.* 110 (2018) 1318–1327. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.08.016>.
- [109] J. Zhai, S. Li, S. Sen, J. Vallvé-Juanico, J.C. Irwin, K.C. Vo, J. Wan, Y. Du, Z.J. Chen, L.C. Giudice, Transcriptomic analysis supports collective endometrial cell migration in the pathogenesis of adenomyosis, *Reprod. Biomed. Online.* 45 (2022) 519–530. <https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2022.05.007>.
- [110] C.A. Stratopoulou, J. Donnez, M.M. Dolmans, P-316 Involvement of collective cell migration in endometrial invasiveness in uterine adenomyosis and the role of M2 macrophages, *Hum. Reprod.* 38 (2023). <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEAD093.674>.
- [111] R. Mayor, S. Etienne-Manneville, The front and rear of collective cell migration, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17 (2016) 97–109. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.14>.
- [112] N. Borghi, M. Lowndes, V. Maruthamuthu, M.L. Gardel, W.J. Nelson, Regulation of cell motile behavior by crosstalk between cadherin- and integrin-mediated adhesions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 13324–13329. https://doi.org/10.1073/PNAS.1002662107/SUPPL_FILE/SM07.AVI.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: GO biological processes and KEGG enriched pathways from the upregulated total proteome fraction in endometriotic lesions. (A) Enriched GO-biological processes and (B) Functional interaction network created by the STRING program. Nodes colors indicates protein involvement in ECM-receptor interaction (red) and focal adhesion (blue) KEGG enriched pathways. Lines thickness indicates the strength of data support.

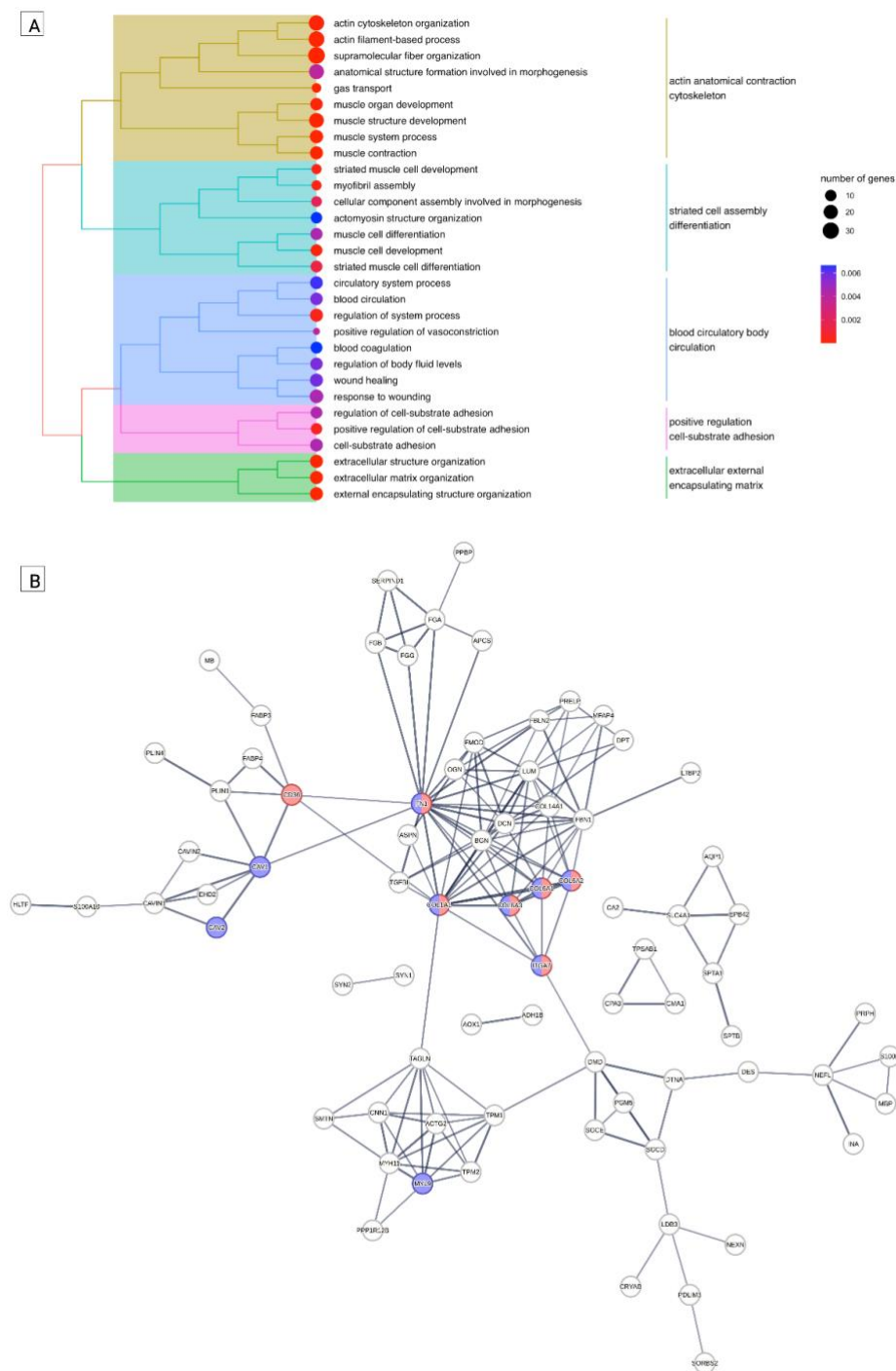


Figure 2: GO biological processes and KEGG enriched pathways from the upregulated phosphoproteome fraction in endometriotic lesions. **(A)** Enriched GO-biological processes and **(B)** Functional interaction network created by the STRING program. Nodes colors indicates protein involvement in ECM-receptor interaction (red), focal adhesion (blue) and regulation of actin cytoskeleton (green) KEGG enriched pathways. Lines thickness indicates the strength of data support.

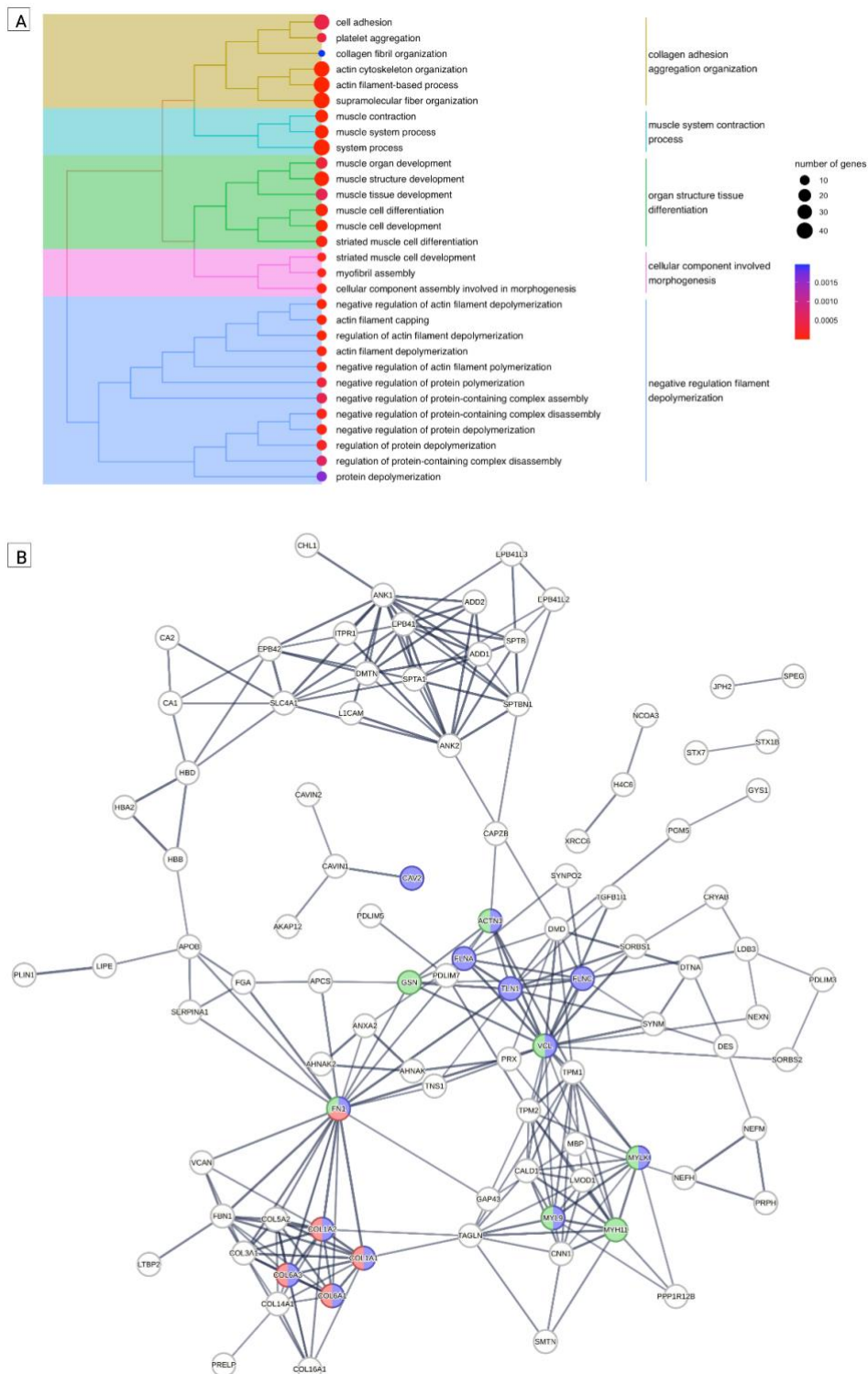
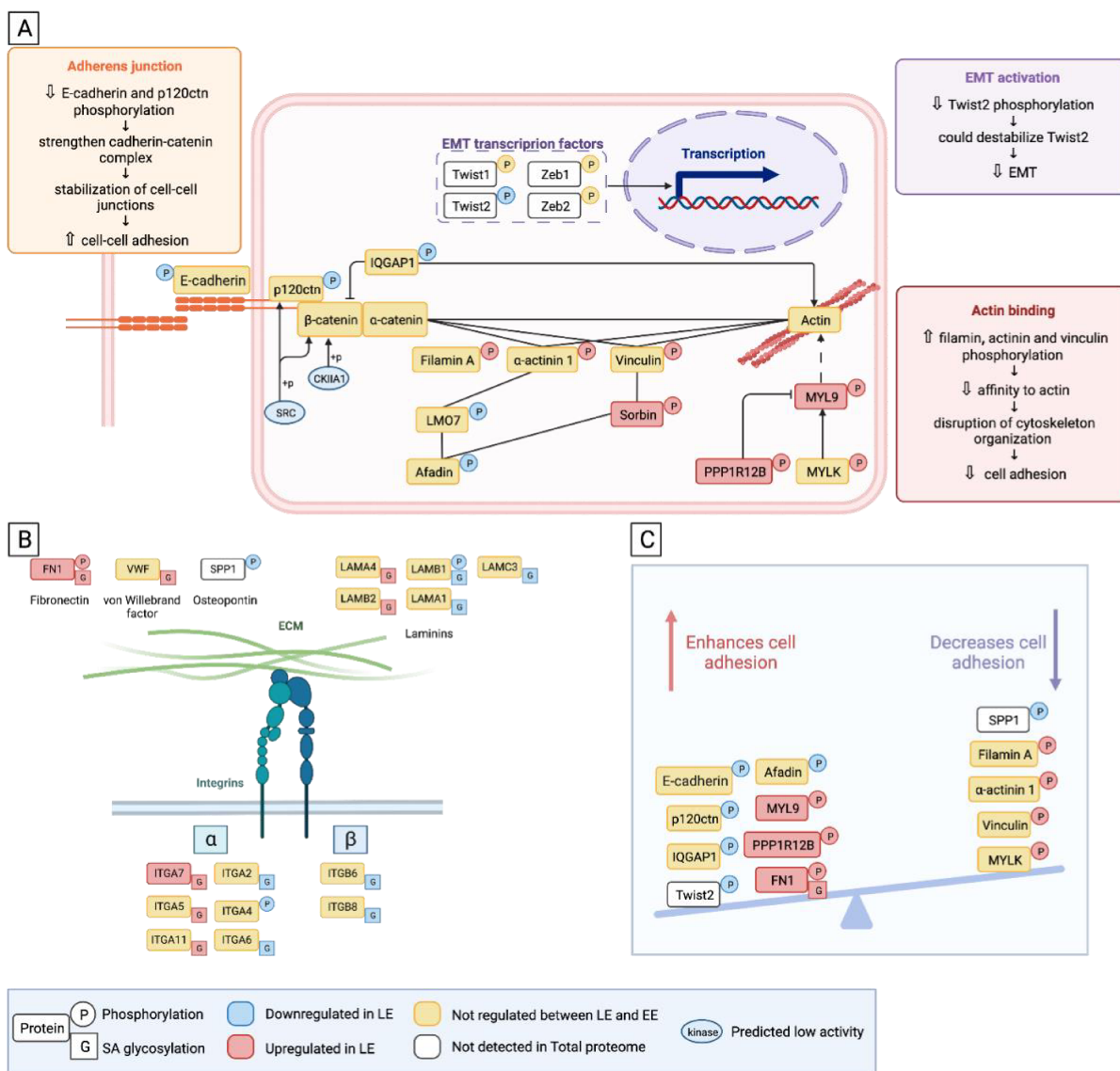
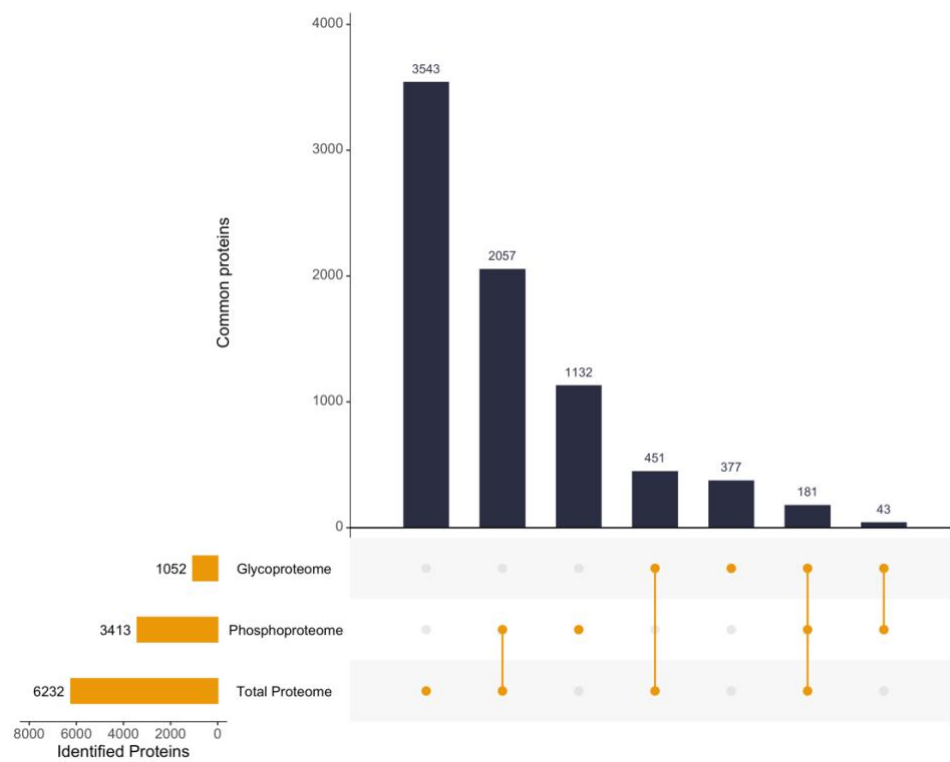


Figure 3: Cell adhesion-related proteins and their post-translational modifications (PTMs) identified in endometriotic lesions. **(A)** Protein-protein interaction network in endometriotic lesions based on the total proteome, phosphoproteome and SA glycoproteome regulations; **(B)** Extracellular matrix (ECM) proteins and integrins subunits differentially regulated in the total proteome, phosphoproteome and SA glycoproteome of endometriotic lesions; **(C)** Proposed cell adhesion balance between the identified regulations in the total proteome, phosphoproteome and SA glycoproteome of endometriotic lesions. Created with BioRender.com.

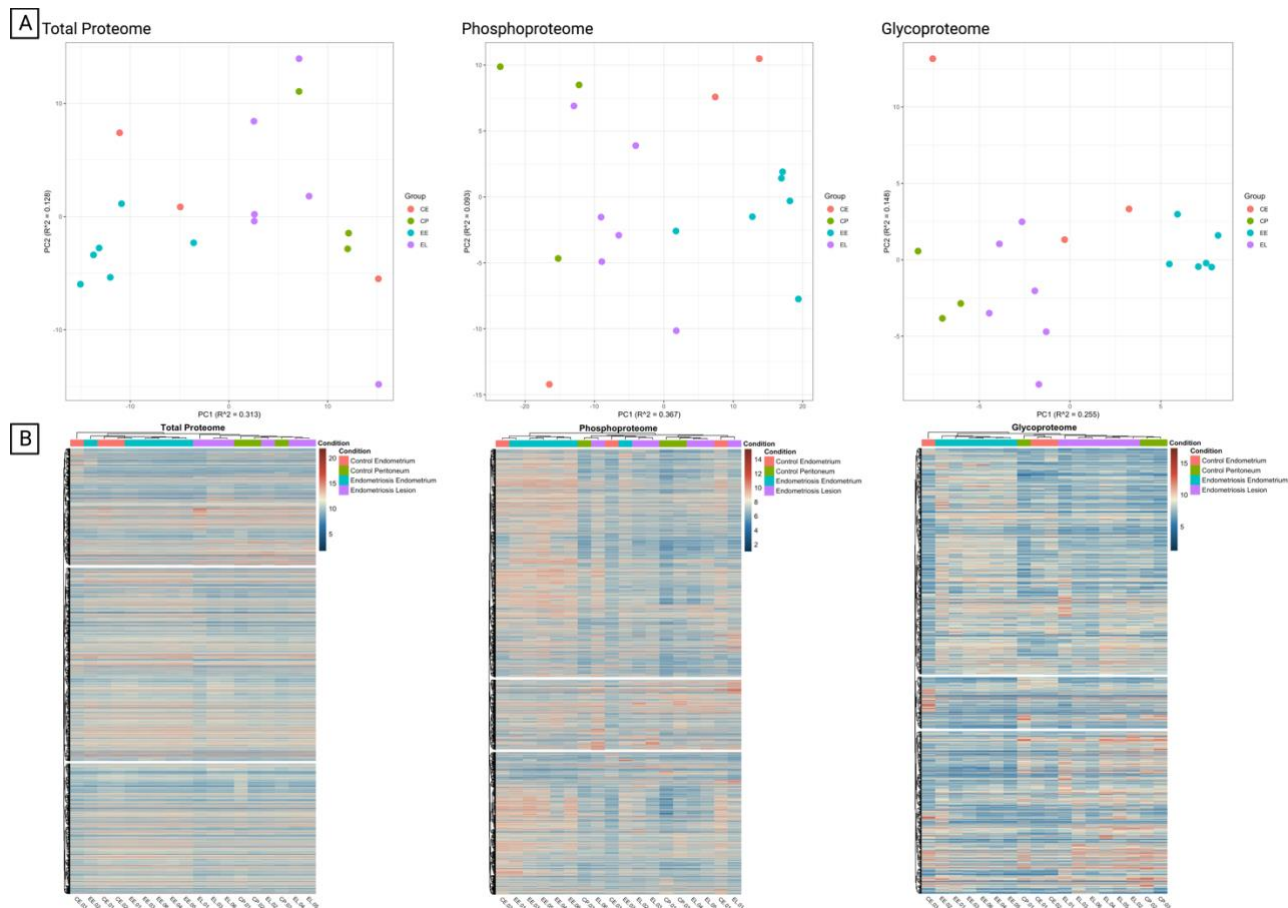


SUPPLEMENTAL FIGURES LEGENDS

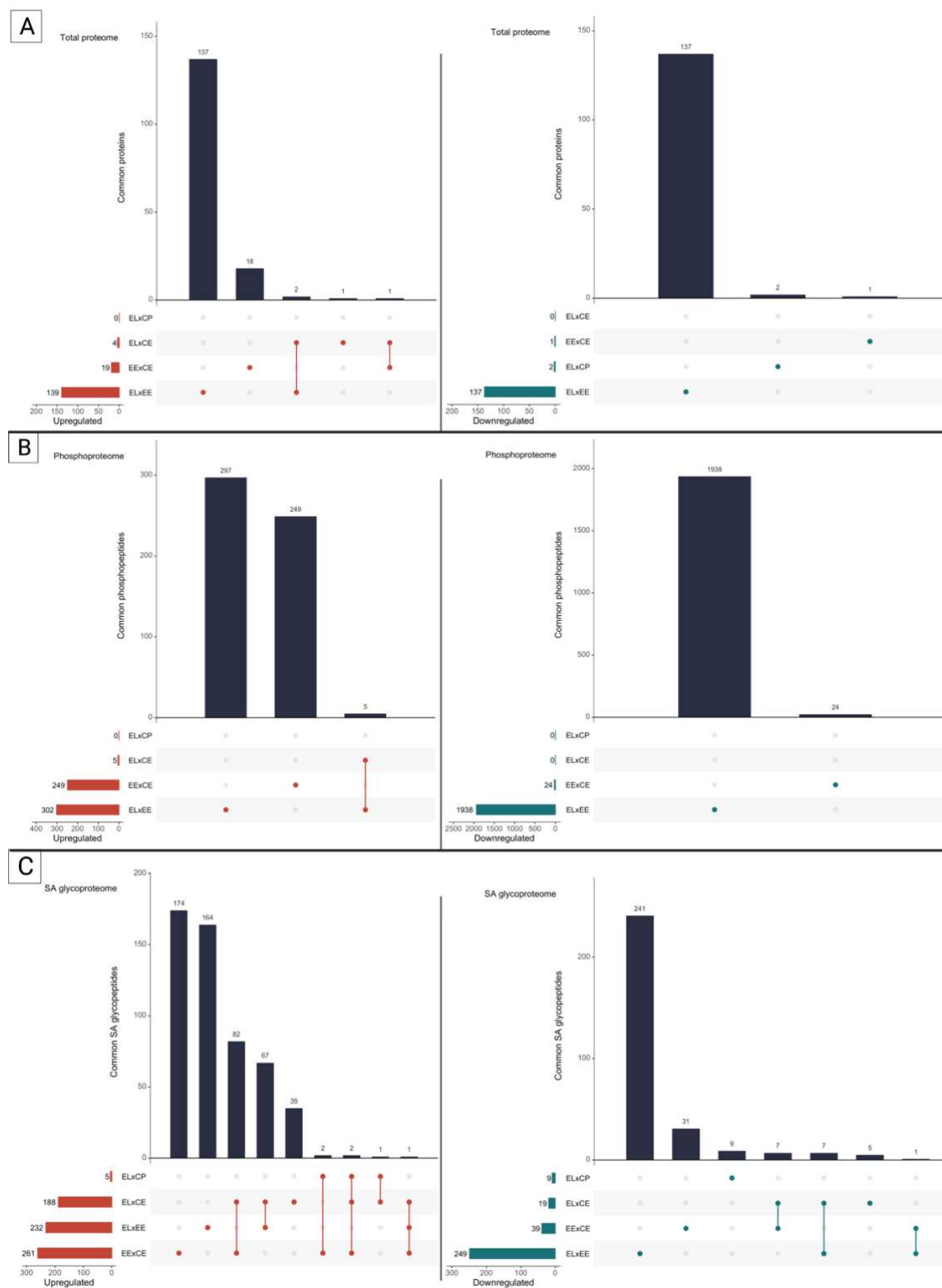
Supplemental Figure 1: Upset plot of identified and quantified proteins in the total proteome, phosphoproteome and SA glycoproteome of the analyzed samples.



Supplemental Figure 2: Overall total proteome and PTMome profile of analyzed samples. **(A)** PCA plots of normalized total proteome, phosphoproteome and SA glycoproteome of Control Endometrium (CE), Control Peritoneum (CP), Endometriosis Endometrium (EE), Endometriosis Lesion (EL); **(B)** Heatmaps of normalized total proteome, phosphoproteome and SA glycoproteome of Control Endometrium, Control Peritoneum, Endometriosis Endometrium, Endometriosis Lesion.

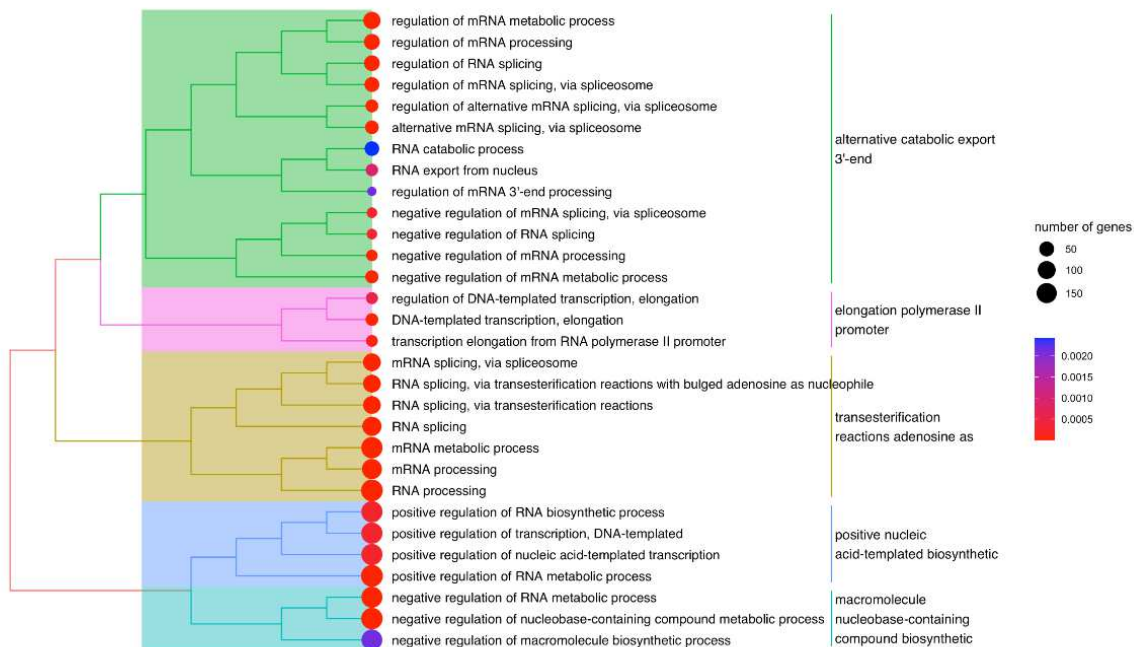


Supplemental Figure 4: Overlap of significantly regulated proteins, phosphopeptides and SA glycopeptides in analyzed groups. Upset plots showing the overlap between differentially regulated (A) proteins, (B) phosphopeptides and (C) SA glycopeptides in the four analyzed groups. Control Endometrium (CE), Control Peritoneum (CP), Endometriosis Endometrium (EE), Endometriosis Lesion (EL).

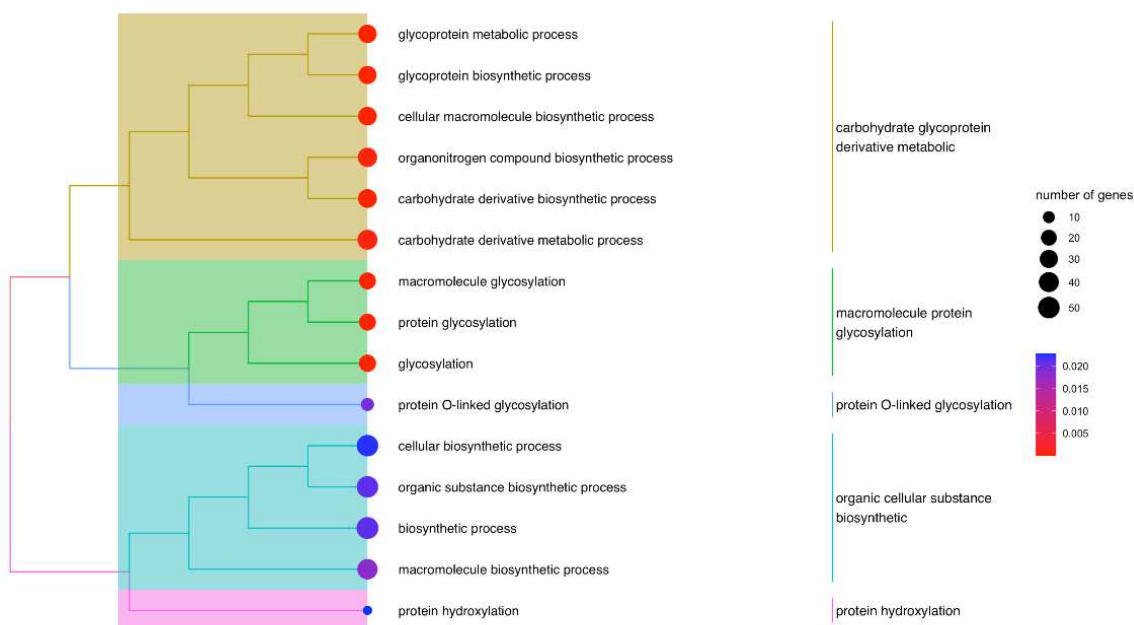


Supplemental Figure 5: Enriched GO biological processes from the downregulated phosphoproteome fraction (A) and the downregulated SA glycoproteome fraction (B) in endometriotic lesions.

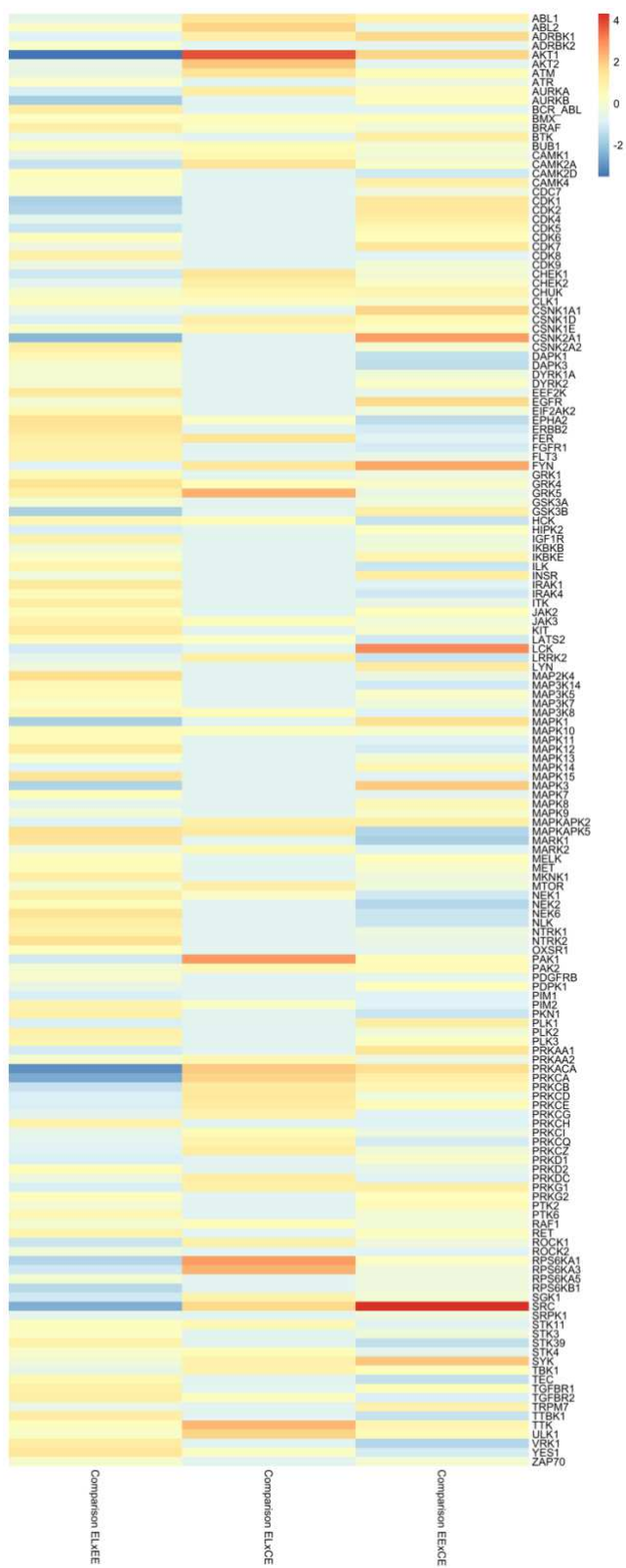
A Phosphoproteome downregulations



B Glycoproteome downregulations



Supplemental Figure 6: Predicted kinases activity between Control Endometrium (CE), Endometriosis Endometrium (EE), Endometriosis Lesion (EL). Plot of KinSwing scores for ELxEE, ELxCE and EExCE (Supplemental Table 4).



ABL1, Abelson tyrosine-protein kinase 1; ABL2, Abelson tyrosine-protein kinase 2; ADRBK1 (GRK2), G protein-coupled receptor kinase 2; ADRBK2 (GRK3), G protein-coupled receptor kinase 3; AKT1, RAC-alpha serine/threonine-protein kinase; AKT2, RAC-beta serine/threonine-protein kinase; ATM, Serine-protein kinase ATM; ATR, Serine/threonine-protein kinase ATR; AURKA, Aurora kinase A; AURKB, Aurora kinase B; BCR-ABL, Fusion of breakpoint cluster region protein (BCR) and Abelson tyrosine-protein kinase 1 (ABL1); BMX, Cytoplasmic tyrosine-protein kinase BMX; BRAF, Serine/threonine-protein kinase B-Raf; BTK, Tyrosine-protein kinase BTK; BUB1, Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1; CAMK1, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type I; CAMK2A, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha; CAMK2D, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta; CAMK4, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV; CDC7, Cell division cycle 7-related protein kinase; CDK1, Cyclin-dependent kinase 1; CDK2, Cyclin-dependent kinase 2; CDK4, Cyclin-dependent kinase 4; CDK5, Cyclin-dependent kinase 5; CDK6, Cyclin-dependent kinase 6; CDK7, Cyclin-dependent kinase 7; CDK8, Cyclin-dependent kinase 8; CDK9, Cyclin-dependent kinase 9; CHEK1, Serine/threonine-protein kinase CHEK1; CHEK2, Serine/threonine-protein kinase CHEK2; CHUK (IKK α), Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha; CLK1, Dual specificity protein kinase CLK1; CSNK1A1 (CK1 α), Casein kinase I isoform alpha; CSNK1D (CK1 δ), Casein kinase I isoform delta; CSNK1E (CK1 ϵ), Casein kinase I isoform epsilon; CSNK2A1 (CK2 α), Casein kinase II subunit alpha; CSNK2A2 (CK2 α'), Casein kinase II subunit alpha prime; DAPK1, Death-associated protein kinase 1; DAPK3 (ZIPK), Death-associated protein kinase 3; DYRK1A, Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A; DYRK2, Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2; EEF2K, Eukaryotic elongation factor 2 kinase; EGFR, Epidermal growth factor receptor; EIF2AK2, Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2 (also known as PKR); EPHA2, Ephrin type-A receptor 2; ERBB2, Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 (also known as HER2); FER, Tyrosine-protein kinase Fer; FGFR1, Fibroblast growth factor receptor 1; FLT3, Receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3; FYN, Tyrosine-protein kinase Fyn; GRK1, Rhodopsin kinase; GRK4, G protein-coupled receptor kinase 4; GRK5, G protein-coupled receptor kinase 5; GSK3A, Glycogen synthase kinase-3 alpha; GSK3B, Glycogen synthase kinase-3 beta; HCK, Tyrosine-protein kinase HCK; HIPK2, Homeodomain-interacting protein kinase 2; IGF1R, Insulin-like growth factor 1 receptor; IKKB, Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta; IKBKE, Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon; ILK, Integrin-linked protein kinase; INSR, Insulin receptor; IRAK1, Interleukin-1 receptor-associated kinase 1; IRAK4, Interleukin-1 receptor-associated kinase 4; ITK, Tyrosine-protein kinase ITK/TSK; JAK2, Tyrosine-protein kinase JAK2; JAK3, Tyrosine-protein kinase JAK3; KIT, Mast/stem cell growth factor receptor Kit; LATS2, Serine/threonine-protein kinase LATS2; LCK, Tyrosine-protein kinase Lck; LRRK2, Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2; LYN, Tyrosine-protein kinase Lyn; MAP2K4, Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4; MAP3K14, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14 (also known as NIK); MAP3K5, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 (also known as ASK1); MAP3K7, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 (also known as TAK1); MAP3K8, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8 (also known as COT); MAPK1, Mitogen-activated protein kinase 1 (also known as ERK2); MAPK10, Mitogen-activated protein kinase 10 (also known as JNK3); MAPK11, Mitogen-activated protein kinase 11 (also known as p38 β); MAPK12, Mitogen-activated protein kinase 12 (also known as p38 γ); MAPK13, Mitogen-activated protein kinase 13 (also known as p38 δ); MAPK14, Mitogen-activated protein

kinase 14 (also known as p38 α); MAPK15, Mitogen-activated protein kinase 15 (also known as ERK7); MAPK3, Mitogen-activated protein kinase 3 (also known as ERK1); MAPK7, Mitogen-activated protein kinase 7 (also known as ERK5); MAPK8, Mitogen-activated protein kinase 8 (also known as JNK1); MAPK9, Mitogen-activated protein kinase 9 (also known as JNK2); MAPKAPK2, MAP kinase-activated protein kinase 2 (also known as MK2); MAPKAPK5, MAP kinase-activated protein kinase 5 (also known as MK5); MARK1, MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1; MARK2, MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2 (also known as PAR-1); MELK, Maternal embryonic leucine zipper kinase; MET, Hepatocyte growth factor receptor (HGFR); MKNK1, MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1; MTOR, Serine/threonine-protein kinase mTOR; NEK1, Serine/threonine-protein kinase Nek1; NEK2, Serine/threonine-protein kinase Nek2; NEK6, Serine/threonine-protein kinase Nek6; NLK, Serine/threonine-protein kinase NLK; NTRK1, Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 (also known as TrkA); NTRK2, Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (also known as TrkB); OXSR1, Serine/threonine-protein kinase OSR1; PAK1, Serine/threonine-protein kinase PAK1; PAK2, Serine/threonine-protein kinase PAK2; PDGFRB, Platelet-derived growth factor receptor beta; PDPK1, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; PIM1, Serine/threonine-protein kinase PIM-1; PIM2, Serine/threonine-protein kinase PIM-2; PKN1, Serine/threonine-protein kinase N1 (also known as PRK1); PLK1, Serine/threonine-protein kinase PLK1; PLK2, Serine/threonine-protein kinase PLK2 (also known as SNK); PLK3, Serine/threonine-protein kinase PLK3 (also known as FNK or PRK); PRKAA1, 5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1; PRKAA2, 5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-2; PRKACA, cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha; PRKCA, Protein kinase C alpha type; PRKCB, Protein kinase C beta type; PRKCD, Protein kinase C delta type; PRKCE, Protein kinase C epsilon type; PRKCG, Protein kinase C gamma type; PRKCH, Protein kinase C eta type; PRKCI, Protein kinase C iota type; PRKCK, Protein kinase C kappa type; PRKCL, Protein kinase C lambda type; PRKCM, Protein kinase C mu type; PRKCN, Protein kinase C nu type; PRKCP, Protein kinase C pi type; PRKCT, Protein kinase C tau type; PRKCU, Protein kinase C upsilon type; PRKCV, Protein kinase C v type; PRKQ, Protein kinase C zeta type; PRKD1, Serine/threonine-protein kinase D1 (also known as PKD1); PRKD2, Serine/threonine-protein kinase D2 (also known as PKD2); PRKDC, DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (also known as DNA-PKcs); PRKG1, cGMP-dependent protein kinase 1 (also known as PKG1); PRKG2, cGMP-dependent protein kinase 2 (also known as PKG2); PTK2, Focal adhesion kinase 1 (also known as FAK); PTK6, Protein tyrosine kinase 6 (also known as BRK); RAF1, RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase; RET, Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret; ROCK1, Rho-associated protein kinase 1; ROCK2, Rho-associated protein kinase 2; RPS6KA1, Ribosomal protein S6 kinase alpha-1 (also known as p90RSK); RPS6KA3, Ribosomal protein S6 kinase alpha-3 (also known as RSK2); RPS6KA5, Ribosomal protein S6 kinase alpha-5 (also known as MSK1); RPS6KB1, Ribosomal protein S6 kinase beta-1; SGK1, Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1; SRC, Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src; SRPK1, Serine/arginine-rich splicing factor kinase 1; STK11, Serine/threonine-protein kinase STK11 (also known as LKB1); STK3, Serine/threonine-protein kinase 3 (also known as MST2); STK39, Serine/threonine kinase 39 (also known as SPAK); STK4, Serine/threonine-protein kinase 4 (also known as MST1); SYK, Tyrosine-protein kinase SYK; TBK1, Serine/threonine-protein kinase TBK1; TEC, Tyrosine-protein kinase Tec; TGFBR1, TGF-beta receptor type-1; TGFBR2, TGF-beta receptor type-2; TRPM7, Transient receptor potential cation channel subfamily M member 7; TTBK1, Tau tubulin kinase 1; TTK, Dual specificity protein kinase TTK (also known as Mps1); ULK1, Serine/threonine-protein kinase ULK1; VRK1, Serine/threonine-protein kinase VRK1; YES1, Tyrosine-protein kinase Yes; ZAP70, Tyrosine-protein kinase ZAP-70.

7. FATORES LIMITANTES DO PROJETO/ESTUDO

Tendo em vista a discussão apresentada, é importante levantar os pontos limitantes do presente estudo. Dentre as amostras analisadas, não foi possível realizar a segmentação inicialmente proposta de dois grupos de estudo para as lesões de endometriose em lesões superficiais (SE) e lesões profundas (DIE) devido à ausência de lesões superficiais tanto no estudo proteômico quanto no retrospectivo. Após a revisão histológica de todas as amostras foi possível observar que lesões classificadas à videolaparoscopia como superficiais na verdade apresentavam padrão infiltrativo profundo, o que impossibilitou a segmentação dos grupos. Como descrito anteriormente, a categorização de lesões superficiais e profundas ainda não possui parâmetros muito bem estabelecidos, sendo feita de forma arbitrária a partir da visualização do clínico à ultrassonografia ou do cirurgião durante os procedimentos cirúrgicos. Desta forma, todas as lesões foram analisadas em um mesmo grupo, sendo necessário se estabelecer parâmetros mais sólidos para classificar as lesões em análises futuras.

Diversos trabalhos na literatura que se propõem a estudar a TEM na endometriose não determinam claramente o tipo de lesão utilizada nas análises, considerando todas as lesões (inclusive de órgãos distintos) como de um mesmo fenótipo. Foi necessário utilizarmos essa mesma abordagem no estudo retrospectivo devido a limitações das amostras já existentes. Já para o estudo proteômico, mesmo não sendo possível segmentar as lesões em superficiais ou profundas, todas as lesões avaliadas foram provenientes da mesma estrutura pélvica. O órgão ou estrutura onde a lesão endometriótica se estabelece é claramente um fator determinante para as alterações moleculares que ela apresenta. Adicionalmente, outros fatores do microambiente como estresse oxidativo, sistema imune, hormônios e inflamação desencadeiam alterações genéticas/epigenéticas/transcricionais/pós-traducionais que podem determinar o desenvolvimento das lesões. Por isso, é importante ressaltar que lesões do ligamento uterossacro foram selecionadas para o estudo proteômico, pois essa estrutura pélvica pode ter uma interferência menor nessa análise das lesões endometrióticas em comparação com estruturas mais complexas, como o intestino ou a bexiga. Ainda assim, a interpretação dos resultados da análise proteômica deve ser feita tendo em vista as limitações de uma análise multi-tecido, sendo necessários experimentos futuros para validação dos nossos achados, como estudos *in vitro* de silenciamento/indução das fosforilações e N-glicosilações contendo ácido siálico de interesse ou a imunomarcagem ou proteômica direcionada desses sítios identificados.

Portanto, a discussão dos resultados apresentados foi realizada levando em consideração essas limitações, e o objetivo deste estudo é fornecer insights relevantes sobre o envolvimento da TEM na patogênese da endometriose, mesmo diante dessas restrições.

8. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos neste estudo e nas condições metodológicas empregadas podemos concluir que:

- As amostras de lesões endometrióticas apresentaram dois padrões histológicos, com glândulas de epitélio colunar bem diferenciado semelhante ao endométrio eutópico, e glândulas de epitélio indiferenciado, com células cúbicas e pavimentosas semelhantes ao mesotélio. Os dois padrões podem coexistir em uma mesma amostra;
- Foi observado um fenótipo epitelial/mesenquimal “misto”, ou uma transição epitélio-mesênquima parcial, nas células epiteliais de lesões de endometriose humanas analisadas, associado à imunomarcagem concomitante de E- e N-caderina, β -catenina e vimentina;
- A expressão gênica de Snail apresentou redução nas amostras de lesões endometrióticas, enquanto ZEB1 teve um aumento de expressão gênica, sugerindo vias de ativação diferentes para esses dois fatores de transcrição no material analisado;
- Devido a baixa imunomarcagem nuclear de β -catenina nas células epiteliais de lesões de endometriose, é possível que a via canônica de sinalização do Wnt/ β -catenina não esteja envolvida na ativação dos fatores de transcrição Snail e ZEB1, nessas amostras.
- As alterações nos padrões de fosforilação e N-glicosilação contendo ácido siálico observadas em marcadores da TEM e em proteínas de ligação ao citoesqueleto de actina sugerem que há manutenção da integridade dos complexos de adesão célula-célula enquanto a adesão célula-MEC parece ter uma regulação mais dinâmica, possivelmente indicando um comportamento de migração coletiva nas lesões endometrióticas analisadas.
- Devido a ausência de alterações nos níveis de proteína dos marcadores da TEM nas lesões endometrióticas não foi possível até o momento correlacionar os achados dos experimentos de proteômica com a expressão gênica e imunohistoquímica nas amostras pareadas, sendo

necessária a obtenção de anticorpos específicos para os sítios modificados observados, ou outros experimentos funcionais para validação desses sítios.

De modo geral, esse estudo abre novas perspectivas para o entendimento dos processos envolvidos na endometriose com um maior foco na transição epitélio-mesenquimal.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAO, M. S. et al. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 82, n. 1, p. 31–40, 2003.

AL-SABBAGH, M.; LAM, E. W. F.; BROSENS, J. J. Mechanisms of endometrial progesterone resistance. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 358, n. 2, p. 208–215, 25 jul. 2012.

ALIMI, Y. et al. The Clinical Anatomy of Endometriosis: A Review. **Cureus**, v. 10, n. 9, 2018.

ANGLESIO, M. S. et al. Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. **The New England journal of medicine**, v. 376, n. 19, p. 1835–1848, 11 maio 2017.

BARANOV, V.; MALYSHEVA, O.; YARMOLINSKAYA, M. Pathogenomics of endometriosis development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, 2018.

BARTLEY, J. et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) seems to be regulated differently in endometriosis and the endometrium. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 289, n. 4, p. 871–881, 2014.

BAUGH, L. et al. Integrating endometrial proteomic and single cell transcriptomic pipelines reveals distinct menstrual cycle and endometriosis-associated molecular profiles. **medRxiv**, p. 2022.01.29.22269829, 1 fev. 2022.

BERX, G.; VAN ROY, F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. **Breast cancer research : BCR**, v. 3, n. 5, p. 289–293, 2001.

BOLL, I. et al. Depolarization-dependent Induction of Site-specific Changes in Sialylation on N-linked Glycoproteins in Rat Nerve Terminals. **Molecular & Cellular Proteomics : MCP**, v. 19, n. 9, p. 1418, 1 set. 2020.

BOYLE, E. I. et al. GO::TermFinder—open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. **Bioinformatics**, v. 20, n. 18, p. 3710–3715, 12 dez. 2004.

CAI, X. et al. Reduced Expression of Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit e and Its Possible Involvement in the Epithelial–Mesenchymal Transition in Endometriosis. **Reproductive Sciences**, v. 25, n. 1, p. 102–109, 1 jan. 2018.

CANIS, M. et al. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. **Fertility and sterility**, v. 67, n. 5, p. 817–821, 1997.

CHAPRON, C. et al. Rethinking mechanisms, diagnosis and management of endometriosis. **Nature Reviews Endocrinology**, 2019.

COHEN, P. The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. **European journal of biochemistry**, v. 268, n. 19, p. 5001–5010, 2001.

CUMMINGS, R. D. “Stuck on sugars - how carbohydrates regulate cell adhesion, recognition, and signaling”. **Glycoconjugate journal**, v. 36, n. 4, p. 241–257, 15 ago. 2019.

ENGHOLM-KELLER, K. et al. **The temporal profile of activity-dependent presynaptic phospho-signalling reveals longlasting patterns of poststimulus regulation**. [s.l: s.n.]. v. 17

ERDE, J.; LOO, R. R. O.; LOO, J. A. Enhanced FASP (eFASP) to Increase Proteome Coverage and Sample Recovery for Quantitative Proteomic Experiments. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 4, p. 1885–1895, 4 abr. 2014.

FERRERO, S. et al. Proteomic analysis of peritoneal fluid in women with endometriosis. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 9, p. 3402–3411, set. 2007.

FERRERO, S. Proteomics in the Diagnosis of Endometriosis: Opportunities and Challenges. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 13, n. 3, p. 1–6, 2019.

FORONI, C. et al. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact. **Cancer treatment reviews**, v. 38, n. 6, p. 689–697, out. 2012.

FURUYA, M. et al. ZEB1 expression is a potential indicator of invasive endometriosis. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 96, n. 9, p. 1128–1135, 1 set. 2017.

GAETJE, R. et al. Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. **The American journal of pathology**, v. 150, n. 2, p. 461–7, fev. 1997.

GAETJE, R. et al. Differential expression of claudins in human endometrium and endometriosis. **Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology**, v. 24, n. 8, p. 442–449, 2008.

GIUDICE, L. C.; KAO, L. C. Endometriosis. TL - 364. **Lancet (London, England)**, 2004.

GREENBURG, G.; HAY, E. D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. **The Journal of cell biology**, v. 95, n. 1, p. 333–339, 1 out. 1982.

GRUND, E. M. et al. Tumor necrosis factor-alpha regulates inflammatory and mesenchymal responses via mitogen-activated protein kinase kinase, p38, and nuclear factor kappaB in human endometriotic epithelial cells. **Molecular pharmacology**, v. 73, n. 5, p. 1394–1404, maio 2008.

HALME, J. et al. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. **Obstet Gynecol**, 1984.

HAN, S. J. et al. Estrogen Receptor β Modulates Apoptosis Complexes and the Inflammasome to Drive the Pathogenesis of Endometriosis. **Cell**, v. 163, n. 4, p. 960–974, 5 nov. 2015.

HAO, Y.; BAKER, D.; DIJKE, P. TEN. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 11, 1 jun. 2019.

HOERSCHER, A. et al. Localization of claudin-2 and claudin-3 in eutopic and ectopic

endometrium is highly similar. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 301, n. 4, p. 1003–1011, 1 abr. 2020.

HORNÉ, F. et al. Impaired Localization of Claudin-11 in Endometriotic Epithelial Cells Compared to Endometrial Cells. **Reproductive Sciences**, v. 26, n. 9, p. 1181–1192, 1 set. 2019.

HUANG, R. Y. J.; GUILFORD, P.; THIERY, J. P. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. **Journal of cell science**, v. 125, n. Pt 19, p. 4417–4422, 2012.

HWANG, J. H. et al. Identification of biomarkers for endometriosis in plasma from patients with endometriosis using a proteomics approach. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, n. 2, p. 725–730, 1 ago. 2014.

IRUNGU, S. et al. Discovery of non-invasive biomarkers for the diagnosis of endometriosis. **Clinical Proteomics**, v. 16, n. 1, p. 1–16, 2019.

JANŠA, V. et al. Proteomic analysis of peritoneal fluid identified COMP and TGFBI as new candidate biomarkers for endometriosis. **Scientific Reports 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 22 out. 2021.

JORDAN, N. V.; JOHNSON, G. L.; ABELL, A. N. Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 10, n. 17, p. 2865–2873, 1 set. 2011.

JUHASZ-BÖSS, I. et al. Endometrial expression of estrogen receptor β and its splice variants in patients with and without endometriosis. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 284, n. 4, p. 885–891, out. 2011.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 1 jun. 2009.

KANG, T. et al. Divalent metal transporter 1 knock-down modulates il-1 β mediated pancreatic beta-cell pro-apoptotic signaling pathways through the autophagic machinery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 1–25, 2021.

KONINCKX, P. R. et al. Pathogenesis of endometriosis: the genetic/epigenetic theory. **Fertility and Sterility**, v. 111, n. 2, p. 327–340, 2019.

KONRAD, L. et al. Similar Characteristics of Endometrial and Endometriotic Epithelial Cells. **Reproductive Sciences**, v. 26, n. 1, p. 49–59, 1 jan. 2019.

KONRAD, L. et al. Epithelial–Mesenchymal Transition in Endometriosis—When Does It Happen? **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, p. 1915, 18 jun. 2020.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 3, p. 178–196, 1 mar. 2014.

LARSEN, M. R. et al. Exploring the sialome using titanium dioxide chromatography and mass spectrometry. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 6, n. 10, p. 1778–1787, out. 2007.

LEE, J. M. et al. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. **The Journal of cell biology**, v. 172, n. 7, p. 973–981, mar. 2006.

LI, G.; SATYAMOORTHY, K.; HERLYN, M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. **Cancer research**, v. 61, n. 9, p. 3819–3825, 1 maio 2001.

LICKERT, H. et al. Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 7, p. 5090–5095, 18 fev. 2000.

LIN, D. et al. Long non-coding RNA AFAP1-AS1 promoting epithelial-mesenchymal transition of endometriosis is correlated with transcription factor ZEB1. **American Journal of Reproductive Immunology**, p. e13074, 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, 2001.

MAEDA, M.; JOHNSON, K. R.; WHEELLOCK, M. J. Cadherin switching: Essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 5, p. 873–887, 2005.

MANOUSOPOULOU, A. et al. Integrated Eutopic Endometrium and Non-Depleted Serum Quantitative Proteomic Analysis Identifies Candidate Serological Markers of Endometriosis. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 13, n. 3, p. 1–8, 2019.

MATSUZAKI, S.; DARCHA, C. Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis†. **Human Reproduction**, v. 27, n. 3, p. 712–721, mar. 2012.

MCEWEN, A. E. et al. E-cadherin phosphorylation occurs during its biosynthesis to promote its cell surface stability and adhesion. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 16, p. 2365–2374, 15 ago. 2014.

MÉAR, L. et al. The Eutopic Endometrium Proteome in Endometriosis Reveals Candidate Markers and Molecular Mechanisms of Physiopathology. **Diagnostics**, v. 12, n. 2, p. 419, 1 fev. 2022.

NAM, D.; KIM, S. Y. Gene-set approach for expression pattern analysis. **Briefings in Bioinformatics**, v. 9, n. 3, p. 189–197, 1 maio 2008.

NIETO, M. A. et al. EMT: 2016. **Cell**, v. 166, n. 1, p. 21–45, 30 jun. 2016.

NISOLLE, M.; CASANAS-ROUX, F.; DONNEZ, J. Coexpression of cytokeratin and vimentin in eutopic endometrium and endometriosis throughout the menstrual cycle: evaluation by a computerized method. **Fertility and Sterility**, v. 64, n. 1, p. 69–75, 1 jul. 1995.

NOBLE, L. S. et al. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 82, n. 2, p. 600–606, fev. 1997.

- PALMISANO, G. et al. A novel method for the simultaneous enrichment, identification, and quantification of phosphopeptides and sialylated glycopeptides applied to a temporal profile of mouse brain development. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 11, n. 11, p. 1191–1202, nov. 2012.
- PARK, S. Y. et al. Snail1 is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. **The EMBO journal**, v. 29, n. 22, p. 3787–3796, 17 nov. 2010.
- PATEL, B. G. et al. Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 96, n. 6, p. 623–632, 1 jun. 2017.
- PEINADO, H.; OLMEDA, D.; CANO, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 6, p. 415–428, jun. 2007.
- PELLEGRINI, C. et al. The expression of estrogen receptors as well as GREB1, c-MYC, and cyclin D1, estrogen-regulated genes implicated in proliferation, is increased in peritoneal endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 98, n. 5, p. 1200–1208, nov. 2012.
- POLINESS, A. E. et al. Proteomic approaches in endometriosis research. **Proteomics**, v. 4, n. 7, p. 1897–1902, 2004.
- PONCELET, C. et al. Expression of cadherins and CD44 isoforms in human endometrium and peritoneal endometriosis. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 81, n. 3, p. 195–203, 1 mar. 2002.
- POSIT TEAM. **RStudio: Integrated Development Environment for R** Boston, MA Posit Software, PBC, , 2022. Disponível em: <<http://www.posit.co/>>
- PRABAKARAN, S. et al. Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 4, n. 6, p. 565–583, nov. 2012.
- PRASAD, C. P. et al. Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK3 β in invasive ductal carcinoma of breast. **BMC Cancer**, v. 9, p. 325, 14 set. 2009.
- QIN, Y. et al. ZEB1 promotes tumorigenesis and metastasis in hepatocellular carcinoma by regulating the expression of vimentin. **Molecular medicine reports**, v. 19, n. 3, p. 2297–2306, 1 mar. 2019.
- REIS, F. M. et al. Superficial Peritoneal Endometriosis: Clinical Characteristics of 203 Confirmed Cases and 1292 Endometriosis-Free Controls. **Reproductive Sciences**, v. 27, n. 1, p. 309–315, 2020.
- ROLLA, E. Endometriosis: advances and controversies in classification, pathogenesis, diagnosis, and treatment. **F1000Research**, v. 8, p. 529, 23 abr. 2019.
- SAMPSON, J. A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 14, n.

4, p. 422–469, 1927.

SÁNCHEZ-TILLÓ, E. et al. ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. **Oncogene**, v. 29, n. 24, p. 3490–3500, 17 jun. 2010.

SAYAT, R. et al. O-GlcNAc-glycosylation of β -catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. **Experimental Cell Research**, v. 314, n. 15, p. 2774–2787, 10 set. 2008.

SCHWÄMMLE, V. et al. PolySTest: Robust statistical testing of proteomics data with missing values improves detection of biologically relevant features. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 19, n. 8, p. 1396–1408, 2020.

SERRANO-GOMEZ, S. J.; MAZIVEYI, M.; ALAHARI, S. K. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. **Molecular Cancer**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2016.

SHOOK, D.; KELLER, R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. **Mechanisms of development**, v. 120, n. 11, p. 1351–1383, 2003.

SIGNORILE, P. G. et al. Endometriosis: A Retrospective Analysis on Diagnostic Data in a Cohort of 4,401 Patients. **In Vivo**, v. 36, n. 1, p. 430–438, 30 dez. 2022.

SOLKIEWICZ, K. et al. Variability of serum IgG sialylation and galactosylation degree in women with advanced endometriosis. **Scientific Reports 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 10 mar. 2021.

STAPPERT, J.; KEMLER, R. A short core region of E-cadherin is essential for catenin binding and is highly phosphorylated. **Cell adhesion and communication**, v. 2, n. 4, p. 319–327, 1994.

STEPHENS, A. N. et al. Post-translational modifications and protein-specific isoforms in endometriosis revealed by 2D DIGE. **Journal of proteome research**, v. 9, n. 5, p. 2438–49, 7 maio 2010.

TAUS, T. et al. Universal and confident phosphorylation site localization using phosphoRS. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 12, p. 5354–5362, 2 dez. 2011.

TEN HAVE, S. et al. Proteomic analysis of protein expression in the eutopic endometrium of women with endometriosis. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 1, n. 10, p. 1243–1251, 2007.

TSENG, J. F. et al. Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 81, n. 3, p. 1118–1122, mar. 1996.

WANG, C. et al. CD147 Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Disassembling Cellular Apoptosis Susceptibility Protein/E-Cadherin/ β -Catenin Complex in Human Endometriosis. **The American journal of pathology**, v. 188, n. 7, p. 1597–1607, 1 jul. 2018.

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

WESSEL, D.; FLÜGGE, U. I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. **Analytical Biochemistry**, v. 138, n. 1, p. 141–143, 1 abr. 1984.

WU, L. et al. PLAGL2 promotes epithelial-mesenchymal transition and mediates colorectal cancer metastasis via β -catenin-dependent regulation of ZEB1. **British journal of cancer**, v. 122, n. 4, p. 578–589, 18 fev. 2020.

WU, M. H. et al. Distinct regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1beta in normal and endometriotic stromal cells. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 90, n. 1, p. 286–295, 2005.

WU, T. et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. **The Innovation**, v. 2, n. 3, p. 100141, 2021.

WU, Y. et al. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. **Cancer cell**, v. 15, n. 5, p. 416–428, 5 maio 2009.

XIONG, W. et al. E 2 -mediated EMT by activation of β -catenin/Snail signalling during the development of ovarian endometriosis. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 23, n. 12, p. 8035–8045, 1 dez. 2019.

XIONG, Y. et al. Hypoxia-inducible factor 1 α -induced epithelial-mesenchymal transition of endometrial epithelial cells may contribute to the development of endometriosis. **Human Reproduction**, v. 31, n. 6, p. 1327–1338, 2016.

XU, H. M. et al. Phosphoproteomics analysis of endometrium in women with or without endometriosis. **Chinese Medical Journal**, v. 128, n. 19, p. 2617–2624, 2015.

XU, J.; LAMOUILLE, S.; DERYNCK, R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. **Cell Research**, v. 19, n. 2, p. 156–172, 20 fev. 2009.

YANG, Y.-M.; YANG, W.-X. Epithelial-to-mesenchymal transition in the development of endometriosis. **Oncotarget**, v. 8, n. 25, p. 41679–41689, 2017.

YU, G. **enrichplot: Visualization of Functional Enrichment Result**, 2022.

YU, M. et al. Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition. **Science**, v. 339, n. 6119, p. 580–584, 1 fev. 2013.

ZONDERVAN, K. T. et al. Endometriosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 9, 19 dez. 2018.

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

10. ANEXOS

10.1. ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

EXPRESSÃO DE MARCADORES DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMA (TEM) NA ENDOEMTRIOSE E SUA RELAÇÃO COM A PATOGENESE DAS LESÕES ENDOMETRIÓTICAS SUPERFICIAIS E PROFUNDAS

Prezada Senhora,

Gostaria de convidá-la a participar de um estudo científico que tem a finalidade de gerar novos conhecimentos sobre a endometriose.

I. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA (grupo controle)

Esta pesquisa visa estudar o funcionamento do endométrio (camada interna do útero) saudável de mulheres sem endometriose e compará-lo com o endométrio e as lesões de endometriose (tecido doente) das pacientes com endometriose, na tentativa de se entender melhor como essa doença se comporta e descobrir novos métodos para diagnosticar e tratar a doença. Você está sendo convidada porque sua avaliação médica já previa a realização de laparoscopia, independentemente da pesquisa. Nesta pesquisa, uma pequena parte (amostra) do tecido doente removido (lesão de endometriose), além de um pequeno fragmento do peritônio (membrana interna do abdômen), serão separados para estudo. Também será coletada uma amostra do seu endométrio (camada interna do útero) através da vagina, sem necessidade de corte nem perfuração. As amostras serão coletadas quando você estiver anestesiada, no bloco cirúrgico, antes e durante a cirurgia da endometriose (laparoscopia).

II. SIGILO DOS DADOS

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a essas informações, que serão utilizadas somente para fins de pesquisa. Está assegurada a garantia de

confidencialidade das suas informações pessoais, sendo garantido que todos os documentos da pesquisa serão anonimizados (sem seu nome), e substituído por códigos (número e letras) antes de serem encaminhados pela equipe médica responsável pelos cuidados do participante aos pesquisadores. A confidencialidade dos seus dados e informações estão garantidos pela Resolução CNS nº 466 de 2012, itens III.2.i e IV.3.e.

III. BENEFÍCIOS DA PESQUISA

Embora não traga benefício imediato para você, este estudo irá contribuir para o conhecimento mais detalhado da endometriose. Esse conhecimento poderá ajudar no desenvolvimento de novos métodos para diagnosticar e tratar a doença.

IV. RISCOS

A coleta de amostra do endométrio pode causar desconforto e cólica momentânea. A amostra será colhida em material inteiramente estéril e descartável, para minimizar os riscos de infecções. A biópsia endometrial será realizada utilizando dispositivo de polipropileno (Pipelle) com diâmetro de 3,1 mm, flexível (como um mini canudinho), que pode ser utilizado ambulatorialmente, inserido na cavidade endometrial sem necessidade de anestesia ou dilatação cervical, com desconforto mínimo. No entanto, esse desconforto será mínimo ou até mesmo inexistente, pois você estará anestesiada para o procedimento cirúrgico, a já ser realizado pelo seu médico.

Rubrica pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

V. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS

De acordo com a Resolução número 466 de 2012 do CNS (Conselho Nacional de Saúde), previsto no item IV.3 g, explicitamos a garantia e o direito de solicitação de ressarcimento e cobertura de quaisquer danos ou despesas decorrentes da sua participação na pesquisa. Portanto, as despesas específicas relacionadas com o estudo são de responsabilidade dos pesquisadores. Caso seja identificado quaisquer problemas de saúde, não identificados previamente durante o seu acompanhamento, garantimos o seu encaminhamento para o tratamento.

VI. DEMAIS ESCLARECIMENTOS

Sua participação na pesquisa não irá onerar o seu plano de saúde, o SUS, e você participante da pesquisa, pois todos os gastos relativos à pesquisa serão de responsabilidade dos pesquisadores. (Resolução nº 466 de 2012, item III.2.o). Todos os resultados da pesquisa serão divulgados em revistas científicas, assim como em forma de seminários, e relatórios para as instituições envolvidas e participantes de pesquisa. Ressaltamos que o seu consentimento para a guarda e utilização do material biológico pode ser retirado a qualquer momento, devendo essa ser formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo participante da pesquisa ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes (Resolução CNS nº 441 de 2011, item 10.I). As amostras serão armazenadas em biorrepositório até o seu processamento, e não serão utilizadas para outras pesquisas além da descrita nesse termo. Qualquer outra avaliação e nova pesquisa a ser realizada com o material biológico armazenado em biorrepositório, só será realizada com o seu consentimento, por meio de TCLE específico realizado por um novo contato (de acordo com a Portaria Nº 2.201 de 2011, artigo 18), e com nova submissão para análise e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep) (Resolução CNS nº. 441 de 2011, item 2.III).

Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar se justificar. A sua aceitação ou não da participação neste estudo não influenciará no seu tratamento. Você poderá solicitar, a qualquer momento, a retirada do consentimento e do seu material biológico armazenado em biorrepositório. A retirada do consentimento deve ser formalizada por escrito e assinada por você, cabendo a equipe de pesquisa a devolução das

amostras existentes (Resolução CNS nº 441 de 2011, item 10.I). Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa.

VII. TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____
voluntariamente, concordo em participar desta pesquisa. Estou ciente do exposto acima e ainda de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo à minha saúde.

Pouso Alegre,de.....de.....

Assinatura da voluntária

Assinatura do pesquisador

Antônio Marcos Coldibelli Francisco

Identificação e contato do pesquisador responsável pesquisa:

- 1) Antônio Marcos Coldibelli Francisco (pesquisador principal) -Telefone: (35) 3423-5988
- 2) Helen Lima Del Puerto – Telefone: (31) 98395-0804

Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo, contatar os pesquisadores e comitês:

- Av. Francisca Ricardina de Paula, 45 Pouso Alegre - MG.
- Comitê de Ética em Pesquisa: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470, Fátima I - Tel. (35) 3449-9270 - CEP 37550-000 POUSO ALEGRE-MG - E-mail: pesquisa@univas.edu.br

Conep – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, endereço: SRTV 701, Via W 5 Norte, lote

D - Edifício PO 700, 3º andar – Asa Norte CEP: 70719-040, Brasília – DF. Horário de

funcionamento: 08:00 as 18:00. Telefone: (61) 3315-5878.