

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

EXPRESSÃO DE MEMBROS DA SUPERFAMÍLIA TGF- $\beta$ , SEUS RECEPTORES E  
SINALIZADORES INTRACELULARES EM CÉLULAS DA GRANULOSA DE  
FOLÍCULOS ANTRAIS DE MULHERES INFÉRTEIS COM ENDOMETRIOSE

EMILY DE CONTO

PORTO ALEGRE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

EXPRESSÃO DE MEMBROS DA SUPERFAMÍLIA TGF- $\beta$ , SEUS RECEPTORES E  
SINALIZADORES INTRACELULARES EM CÉLULAS DA GRANULOSA DE  
FOLÍCULOS ANTRAIS DE MULHERES INFÉRTEIS COM ENDOMETRIOSE

EMILY DE CONTO

Orientador:

Prof. Dr. João Sabino Lahorgue da Cunha Filho

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor em Medicina: Ciências  
Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina:  
Ciências Médicas.

PORTO ALEGRE

2018

## **Agradecimentos**

Ao professor Dr. João Sabino, eu agradeço a confiança, as oportunidades e a atenção nesses nove anos de parceria na pesquisa.

À professora Ursula, o suporte científico.

Aos colegas João Paolo e Vanessa, o companheirismo.

Aos amigos Charles e Juliana por compartilharmos a experiência na vida acadêmica.

Aos amigos Marlon e Rosa, agradeço a cumplicidade e parceria.

Agradeço à minha família, mãe e avó. À minha mãe, por ser minha inspiração como pessoa e profissional, por ter me dado incentivo e condições de alçar esses voos e, especialmente, pelo amor. À minha avó, sempre atenta a me ouvir e disposta a aprender as minhas descobertas científicas.

Thiago, meu companheiro, paciente e amoroso mesmo nos dias mais difíceis.

Gaia, minha continuação, a filha que é alegria e me ensina a viver o presente.

## **RESUMO**

### **Base teórica**

O desenvolvimento oocitário depende da comunicação bi-direcional entre o oócito e as células da granulosa e da teca; e os membros da superfamília TGF- $\beta$  são responsáveis por essa comunicação, desempenhando importante papel nos processos de foliculogênese e oogênese. A endometriose é uma doença que causa infertilidade e já foi determinado que o *AMH*, membro da superfamília TGF- $\beta$ , apresenta genótipo polimórfico nesse grupo de pacientes, além de estar estabelecido na literatura que há comprometimento das células da granulosa nessa doença.

### **Objetivo**

Determinar a expressão gênica dos ligantes (*AMH*, *BMP-6*, *GDF-9*, *INHA*, *INHBB* e *TGF $\beta$ 3*), receptores (*AMHR2*, *BMPR2* e *TGF $\beta$ R3*) e sinalizadores intracelulares (*SMAD3* e *SMAD4*) em células da granulosa de folículos antrais de mulheres inférteis com endometriose.

### **Métodos**

Estudo caso-controle em que se avaliou a expressão de membros da superfamília TGF- $\beta$  em mulheres inférteis com endometriose comparando-as com mulheres submetidas à fertilização *in vitro* por infertilidade tubária ou masculina através de PCR em tempo real com sondas TaqMan.

### **Resultados**

Os dados dos ciclos de reprodução assistida e a idade não apresentaram diferença estatística entre os grupos estudados. A análise de expressão dos genes demonstrou que o ligante *BMP-6*, com Quantificação Relativa de 0,431 (QR: 0,355-0,524) ( $P=0,013$ ) e o sinalizador intracelular *SMAD4*, com Quantificação Relativa de 0,624 (QR: 0,529-0,735) ( $P=0,044$ ) apresentam níveis diminuídos nas pacientes inférteis com endometriose em comparação com o grupo controle. Os demais genes não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

### **Conclusão**

O grupo de pacientes inférteis com endometriose apresentou expressão de *BMP-6* e *SMAD4* reduzidas, indicando que o desenvolvimento oocitário é deficiente nestas pacientes no que compete às funções da *BMP-6* e que deve haver comprometimento de todas as rotas sinalizadas pelo *SMAD4*.

### **Palavras chave**

Endometriose – Infertilidade – Expressão gênica – Superfamília TGF- $\beta$

## **ABSTRACT**

### **Base theory**

Oocyte development depends on the bi-directional communication between the oocyte and the granulosa and theca cells, and the members of the TGF- $\beta$  superfamily are responsible for this communication, playing an important role in folliculogenesis and oogenesis. Endometriosis is a disease that causes infertility, and it has been determined that anti-Müllerian hormone (*AMH*), a member of the TGF- $\beta$  superfamily, shows genetic polymorphism in this group of patients, besides being established in the literature that granulosa cells are involved in this disease.

### **Objective**

The aim of this study was to determine gene expression of the ligands *AMH*, *BMP-6*, *GDF-9*, *INHA*, *INHBB* and *TGF $\beta$ 3*, receptors *AMHR2*, *BMPR2* and *TGF $\beta$ R3*, and intracellular signal transducers *SMAD3* and *SMAD4* in antral follicle granulosa cells from infertile women with endometriosis.

### **Methods**

A case-control study was conducted to evaluate the expression of TGF- $\beta$  superfamily members in infertile women with endometriosis, comparing them with women undergoing *in vitro* fertilization due tubal or male infertility through real-time PCR with TaqMan probes.

### **Results**

The data of assisted reproduction cycles and age did not show statistical difference between the groups studied. Expression analysis of the genes demonstrated that the ligand *BMP-6* with Relative Quantification of 0.431 (RQ=0.355-0.524) ( $P=0.013$ ) and the signal transducer *SMAD4* with Relative Quantification of 0.624 (RQ=0.529-0.735) ( $P=0.044$ ), indicating decreased expression levels in patients with endometriosis compared to the control group. The other genes did not exhibit significant differences between the groups.

### **Conclusion**

The group of patients with endometriosis had reduced expression of *BMP-6* and *SMAD4*, indicating that oocyte development is deficient in these patients, with regard to BMP-6 functions, and that all SMAD4 signaling pathways should be impaired.

### **Keywords**

Endometriosis – Infertility – Gene Expression – TGF- $\beta$  Superfamily

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Resultado da busca de informações para a Revisão da Literatura nas bases de dados Embase, PubMed e SciELO. .... 13
- Figura 2.** Modelo de desenvolvimento oocitário proposto por Gougeon em 1986. (Fonte: Gougeon, 1986) ..... 15
- Figura 3.** Membros da superfamília TGF- $\beta$  envolvidos na comunicação entre o oócito e as células da granulosa e da teca. (Fonte: Knight et al., 2006) ..... 18
- Figura 4.** Esquema da sinalização intracelular via SMAD decorrente da ativação de receptores transmembrana por membros da superfamília TGF- $\beta$ . ..... 21

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### SIGLA – Significado

AMH – anti-Mullerian hormone (hormônio anti-Mulleriano)

AMHR2 – anti-Mullerian hormone Type II receptor (receptor tipo 2 de hormônio anti-Mulleriano)

ASRM – American Society for Reproductive Medicine (Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva)

BMPs – bone morphogenetic proteins (proteínas morfogenética óssea)

BMP-6 – bone morphogenetic protein 6 (proteína morfogenética óssea 6)

BMP-15 – bone morphogenetic protein 15 (proteína morfogenética óssea 15)

BMPR2 – bone morphogenetic protein receptor type II (receptor de proteína morfogenética óssea tipo II)

CG – célula da granulosa

Co-SMAD – common mediator SMAD (mediador comum SMAD)

CT – célula da teca

ESHRE – European Society of Human Reproduction and Embryology (Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia)

FIV – fertilização *in vitro*

FSH – follicle stimulating hormone (hormônio folículo estimulante)

GDFs – growth and differentiation factors (fatores de crescimento e diferenciação)

GDF-9 – growth and differentiation factor 9 (fator de crescimento e diferenciação 9)

INH $\alpha$  – inhibin alpha subunit (subunidade alfa de inibina)

INH $\beta$ B – inhibin beta B subunit (subunidade inibina beta B)

I-SMAD – inhibitory SMAD protein (proteína SMAD inibitória)

LH – luteinizing hormone (hormônio luteinizante)

LHR – luteinizing hormone receptor (receptor de hormônio luteinizante)

R-SMAD – receptor-regulated SMAD protein (proteína SMAD regulada por receptores)

SMAD – small mothers against decapentaplegic

SMAD1 – SMAD family member 1 (membro 1 da família SMAD)

SMAD2 – SMAD family member 2 (membro 2 da família SMAD)

SMAD3 – SMAD family member 3 (membro 3 da família SMAD)

SMAD4 – SMAD family member 4 (membro 4 da família SMAD)

SNP – single nucleotide polymorphism (polimorfismo de nucleotídeo simples)

TGF- $\beta$  – transforming growth factor beta (fator de crescimento transformador)

TGF $\beta$ 1 – transforming growth factor beta-1 (fator de crescimento transformador beta-1)

TGF $\beta$ 3 – transforming growth factor beta-3 (fator de crescimento transformador beta-3)

TGF $\beta$ R3 – transforming growth factor beta receptor type III (receptor de fator de crescimento transformador beta tipo III)



## Sumário

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....  | 10 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA .....   | 13 |
| 2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações .....      | 13 |
| 2.2 Desenvolvimento oocitário .....                                   | 13 |
| 2.3 Superfamília TGF- $\beta$ .....                                   | 15 |
| 2.4 Processamento dos ligantes, seus receptores e a sinalização ..... | 20 |
| 2.5 Endometriose .....  | 22 |
| 2.6 Endometriose e infertilidade.....                                 | 24 |
| 2.7 Superfamília TGF- $\beta$ e endometriose .....                    | 25 |
| 3 MARCO CONCEITUAL.....   | 27 |
| 4 OBJETIVOS .....   | 28 |
| 5 HIPÓTESE NULA.....  | 29 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                    | 30 |
| 7 ARTIGO.....   | 39 |
| 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS (Conclusões) .....                             | 62 |
| 9 PERSPECTIVAS.....   | 63 |
| 10 ANEXOS .....   | 64 |

## 1 INTRODUÇÃO

Fêmeas de mamíferos nascem com um número fixo de oócitos em seus ovários e, em condições fisiológicas normais, o balanço entre o pool de oócitos no nascimento e a depleção desses oócitos ao longo da vida determina a reserva ovariana (1).

O desenvolvimento do complexo oócito-folículo pode ser dividido em duas fases principais: a fase pré-antral, regida principalmente por fatores intraovarianos da superfamília de fatores de crescimento transformantes  $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$  - TGF- $\beta$ ), e a fase antral, regida por membros da superfamília TGF- $\beta$  e pelos hormônios folículo estimulante (Follicle Stimulating Hormone - FSH) e luteinizante (Luteinizing Hormone - LH) liberados pela adenoipófise (2). A importância da superfamília TGF- $\beta$  na comunicação entre o oócito e as células do folículo ovariano está bem sedimentada na literatura (3, 4, 5, 6).

Os principais membros da superfamília TGF- $\beta$  a regularem as fases pré-antral e antral são as proteínas morfogenéticas ósseas (Bone Morphogenetic Protein - BMPs), os fatores de crescimento e diferenciação (Growth Differentiation Factor - GDFs), hormônio anti-Mulleriano (Anti-Mullerian Hormone - AMH), fatores de crescimento transformantes (Transforming Growth Factor- $\beta$  - TGF $\beta$ s), inibinas e ativinas (4). Esses fatores são produzidos pelo oócito e/ou pelas células do folículo e agem de forma autócrina e/ou parácrina (4). Dentre eles, destacam-se o AMH que limita o crescimento de folículos pré-antrais e antrais através da regulação da sua sensibilidade ao FSH (7); BMP-6 que contribui para a sobrevivência de folículos saudáveis (8); BMP-15 e GDF-9 que induzem a proliferação, diferenciação, apoptose e luteinização das células da granulosa e da teca nos folículos primário e secundário (9, 10); inibinas que regulam a síntese de FSH pela hipófise e diminuem o efeito das ativinas por competição (11, 12), e TGF $\beta$ 3 que induz a síntese de estradiol nas células da granulosa (13).

A funcionalidade das proteínas da superfamília TGF- $\beta$  se dá através da sua ligação a receptores transmembrana na célula-alvo que, por sua vez, desencadeiam sinalização intracelular via fatores de transcrição da família SMAD (small mothers against decapentaplegic) que se deslocam do citoplasma para o núcleo onde contribuem para a regulação da transcrição de genes-alvo (14, 15, 16). A principal consequência da ação dessas proteínas é a mitose e diferenciação das células do

folículo e a promoção do desenvolvimento e maturação do oócito de forma que se torne competente para a fertilização.

A endometriose é uma desordem ginecológica benigna estrogênio-dependente caracterizada pela presença/disseminação de tecido endometrial fora da cavidade uterina resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais (17). Essa doença afeta aproximadamente uma em cada sete mulheres em idade reprodutiva (17) e estima-se que 50% das pacientes com endometriose sejam, ao menos, subférteis (18). O diagnóstico comumente é realizado com atraso de cerca de 13 anos, pois as pacientes pensam que a dismenorreia é normal e não buscam esclarecer a sua causa (19). Após o diagnóstico, o tratamento pode ser hormonal ou cirúrgico e a decisão deve levar em consideração o desejo de gestar por parte da paciente e é comum que as pacientes precisem ser submetidas a técnicas de reprodução assistida para tornar a gestação possível (20, 21).

A associação entre endometriose e infertilidade é bastante clara, porém a maneira como isso acontece ainda não está bem determinado. Algumas ideias foram desenvolvidas e contribuem para o entendimento, como a influência da distorção anatômica e inflamação decorrentes da endometriose no ambiente da concepção (22), e insuficiência da fase lútea (23) com níveis diminuídos de progesterona (24) que influenciam a receptividade endometrial ao embrião (22, 25). E alterações genéticas também vêm sendo estudadas, como a expressão diminuída do gene *Hoxa10* que reflete negativamente na receptividade do endométrio e, conseqüentemente, na taxa de implantação (26), a presença do polimorfismo genético do receptor de LH (*LHR*) na infertilidade associada à endometriose causando disfunção ovulatória (27); e a associação do alelo polimórfico do *AMH* para o polimorfismo p.Ile49Ser com o grupo de pacientes inférteis com endometriose (28). Além disso, está estabelecido que há anormalidades funcionais nas células da granulosa dessas mulheres, como insuficiência lútea (23, 24), esteroidogênese folicular prejudicada (29, 30), expressão reduzida de aromatase P450, aumento da geração de espécies reativas de oxigênio intracelular e sinais apoptóticos aumentados (30).

Membros da superfamília TGF- $\beta$  vêm sendo estudados na busca pelo entendimento da patogênese da endometriose (31), e foram descobertas informações importantes: a ativina A cria condições para a sobrevivência e o desenvolvimento da lesão ectópica (32, 33); *AMH* e seu receptor *AMHR2* são expressos em lesões endometrióticas (34); *TGF $\beta$ 1*, *SMAD1* e *SMAD4* estão supra-regulados no endométrio

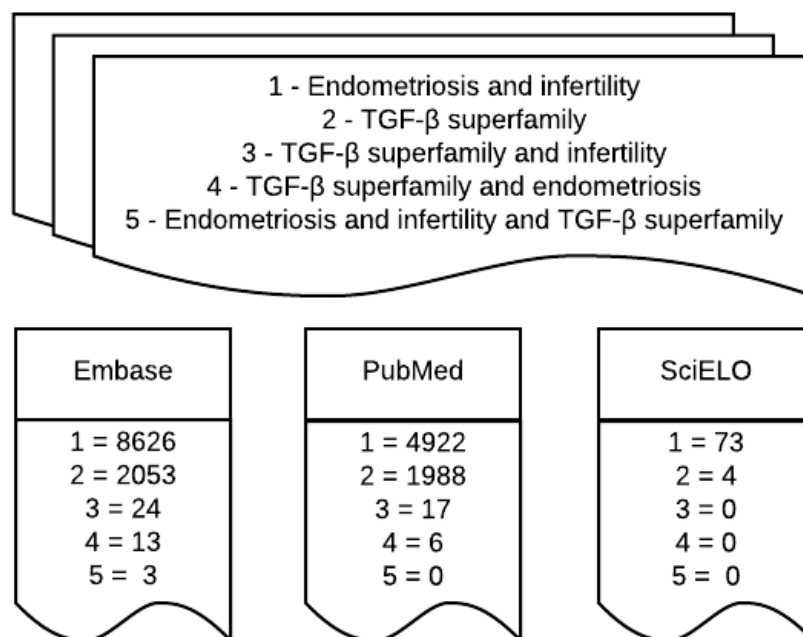
eutópico de pacientes com endometriose (35);  $TGF\beta 1$  é sintetizado pelo endometrioma e promove sua adesão ao tecido ovariano (36, 37, 38); *BMP-6* é expressa no endométrio ectópico contribuindo para mecanismos de fixação, sobrevivência e expansão da endometriose (39). Entretanto, poucos trabalhos exploraram essas proteínas como influenciadoras da fertilidade na endometriose. Sabe-se que mulheres com endometriose apresentam menor concentração de *GDF-9* no fluido folicular (40), *GDF-9* tem expressão diminuída na endometriose moderada a severa (41) e que existe associação de genótipo polimórfico do *AMH* em pacientes inférteis com endometriose (28).

Esses achados evidenciam a necessidade de explorar mais o conhecimento sobre o comportamento da superfamília  $TGF-\beta$  na infertilidade associada à endometriose, por isso sugerimos investigar a expressão gênica de membros da superfamília  $TGF-\beta$  na fase antral do desenvolvimento folicular (*AMH*, *BMP-6*, *GDF-9*, *INHA*, *INHBB* e *TGF $\beta$ 3*), juntamente com seus receptores (*AMHR2*, *BMPR2* e *TGF $\beta$ R3*) e sinalizadores intracelulares (*SMAD3* e *SMAD4*) para compreender melhor a fisiologia dessas proteínas na endometriose.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura foca em aspectos relacionados à endometriose e infertilidade e aos membros da superfamília TGF- $\beta$ . Dessa forma, foram utilizados os termos “endometriosis”, “infertility” e “TGF- $\beta$  superfamily” e suas combinações. A pesquisa foi realizada nas bases de dados Embase, PubMed e SciELO no período de 1960 a 2018. A Figura 1 exibe o resultado desta busca de informações.



**Figura 1.** Resultado da busca de informações para a Revisão da Literatura nas bases de dados Embase, PubMed e SciELO.

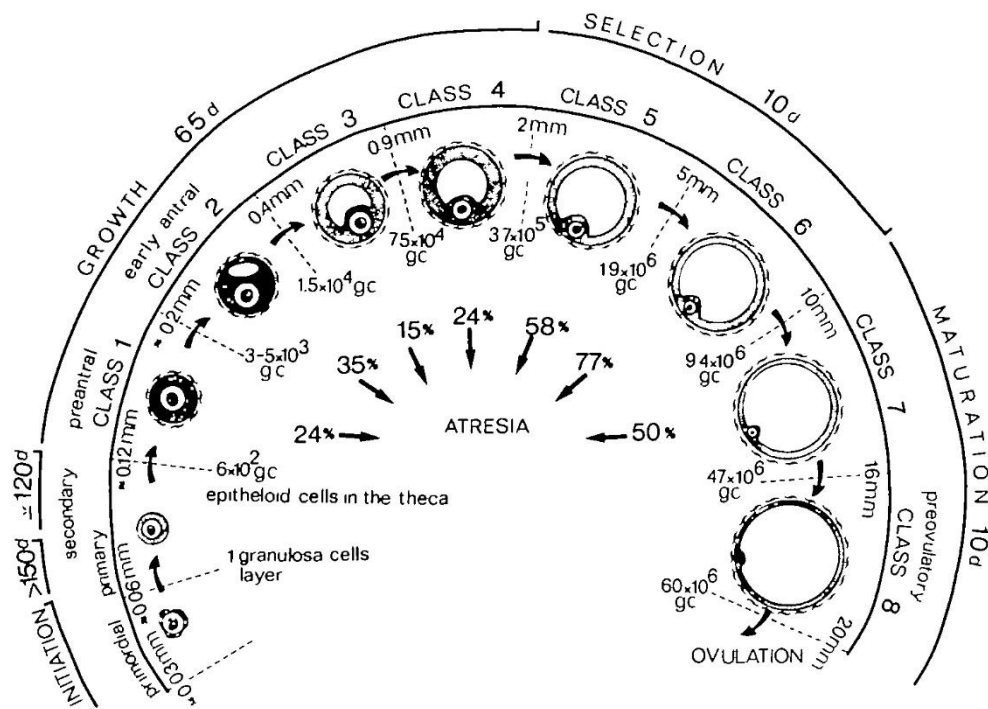
### 2.2 Desenvolvimento oocitário

O desenvolvimento oocitário depende de dois processos que ocorrem simultaneamente no interior do ovário: oogênese e foliculogênese. O primeiro consiste no desenvolvimento do oócito, a célula germinativa; e o segundo, no desenvolvimento das camadas de células que formam o folículo que envolve essa unidade germinativa (2). Esses processos começam na embriogênese com a formação dos folículos primordiais que compõem a reserva ovariana (estoque de folículos imaturos de oócitos ainda não capacitados que ficam armazenados no ovário em estado de dormência -

estágio de Prófase I da meiose) e se encerram na menopausa que é consequência da depleção quase total desses folículos e marca o fim da vida reprodutiva feminina (12).

Os complexos folículo-oócito começam a ser liberados da dormência na puberdade, início da vida reprodutiva feminina. A cada ciclo reprodutivo, folículos saem da dormência e se desenvolvem através de uma série de fases coordenadas cujo resultado é a ovulação (42). Gougeon, em 1986, propôs que o desenvolvimento do folículo fosse subdividido em 8 classes e é possível observar com clareza a divisão em duas fases principais: a fase pré-antral e a fase antral (Figura 2) (2). A fase pré-antral consiste na parte inicial do crescimento do folículo, é a evolução do folículo primordial a folículo primário e secundário chegando ao tamanho de aproximadamente 0,2 mm de diâmetro. Estão envolvidos nessa fase apenas fatores de crescimento locais. A maior marca desta fase é a proliferação de células da granulosa (CG) e células da teca (CT): a organização destas células leva à formação de uma cavidade cheia de líquido – o antro – e é nesse momento que se inicia a fase antral. Na fase antral, o folículo (com 0,2 mm e antro inicial) começa a responder às gonadotrofinas (43). No início, o crescimento do folículo depende do balanço da ação do FSH, que promove o seu crescimento, e da ação do AMH, que regula a sua sensibilidade ao FSH (12). Este é o momento em que ocorre a seleção do folículo dominante, este folículo já tem receptores de FSH e LH em sua superfície e passa a responder a estes hormônios até que se torne folículo pré-ovulatório com 16 mm e ovulatório com aproximadamente 20 mm de diâmetro (2).

A comunicação bidirecional entre o oócito e as CG e CT, que formam o folículo, determina esse desenvolvimento e depende da ação de fatores intra e extraovarianos que agem de forma autócrina e parácrina (44). No grupo de fatores intraovarianos, podem ser citados alguns membros da Superfamília TGF- $\beta$ : GDF-9, BMP-6 e -15, Inibinas, Ativinas e AMH. Os fatores extraovarianos são as gonadotrofinas: FSH e LH, secretadas pela adenoipófise (12).



**Figura 2.** Modelo de desenvolvimento oocitário proposto por Gougeon em 1986.

(Fonte: Gougeon, 1986)

### 2.3 Superfamília TGF- $\beta$

Os membros da Superfamília TGF-  $\beta$  são proteínas envolvidas em uma série de eventos fisiológicos em vários tecidos como diferenciação, apoptose, proliferação e especificação celular, e sua ação se dá de forma autócrina ou parácrina regulando a expressão gênica por meio da ativação de receptores transmembrana que deflagram a ação de fatores de transcrição intracelulares SMAD junto a outros co-fatores transcricionais (45). Este grupo de mais de 40 proteínas é subdividido em famílias menores: subfamília TGF- $\beta$ , subfamília ativina/inibina, AMH, BMPs e GDFs (12).

Estudos realizados *in vivo* e *in vitro* com diversas espécies mostram que fatores desta família são expressos no ovário sendo relacionados com a formação do estoque de folículos na fase embrionária e, após, nas fases de recrutamento, crescimento e diferenciação de oócitos e folículos (tanto na fase pré-antral quanto na fase antral) podendo estar relacionados com o controle da reserva ovariana através do seu envolvimento na atresia folicular (9, 12, 46).

### TGF $\beta$ s

Os TGF $\beta$ s são citocinas homodiméricas e, em mamíferos, são sintetizadas em três isoformas: TGF $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3 (9). Embora alguns estudos tenham sido realizados em camundongos, ainda são escassas as informações sobre os efeitos dessas proteínas na formação dos oócitos ou na montagem e ativação dos folículos primordiais (12). Entretanto, foi relatado que promovem a proliferação de CG e o crescimento de folículos pré-antrais (47) e que atuam sobre a produção de progesterona e síntese de estrogênio dependente de FSH (48). Sabe-se que os TGF $\beta$ s estimulam a produção das inibinas A e B em ratos no período pós-natal e, além disso, sua função principal está relacionada à fase antral, pois aumentam o diâmetro de folículos de ratos adultos (49). Recentemente, foi relatado que o TGF $\beta$ 1 regula positivamente a expressão da conexina 43 que é abundantemente expressa no ovário e fundamental para a comunicação célula-célula em células da granulosa humanas (50).

#### Ativina, inibina e folistatina

Ativinas são homo e heterodímeros formados por subunidades  $\beta$ A e  $\beta$ B, que resultam em três moléculas: ativina A, ativina B e ativina AB, as formas A e B são as mais comuns (9). Seus receptores são expressos em células germinativas (oogônias e oócitos) e em células somáticas (células da granulosa, da teca e luteais), e seu efeito pode ser diminuído por dois tipos de proteínas: inibina e folistatina. Essas três proteínas (ativina, inibina e folistatina) são secretadas pelas células da granulosa e flutuam simultaneamente no ovário (51).

Um estudo com ovários fetais humanos revelou que a ativina e seu receptor são expressos no período anterior à formação dos folículos primordiais, este dado sugere que a ativina esteja envolvida na regulação da proliferação e da sobrevivência das células germinativas (52). A ativina também estimula a expressão de receptores para o FSH nas CG e age junto com este hormônio regulando a proliferação e a diferenciação dessas células em estágios avançados da foliculogênese (9). As ativinas A, B e AB ainda diminuem a produção de progesterona em células da granulosa humanas (53, 54), entretanto, a capacidade de induzir a liberação de FSH é a função com maior destaque dessas moléculas (55).

A inibina é uma proteína sintetizada em duas isoformas, A e B, formadas por subunidades  $\alpha$  e pelas mesmas subunidades  $\beta$  das ativinas, isso faz com que possam se ligar aos receptores das ativinas diminuindo seu efeito por competição (12). Além disso, exercem papel endócrino, por meio da circulação, na adenoipófise, suprimindo



a secreção de FSH (49). A inibina B parece ser a forma fisiologicamente relevante durante a fase folicular do ciclo menstrual (56).

A folistatina é uma glicoproteína extracelular encontrada em três isoformas: FST288, FST303 e FST315, e apresenta alta afinidade pela ativina de forma que, ligando-se a ela, a impede de interagir com o seu receptor de sinalização (12).

### AMH

AMH é uma proteína produzida pelas CG de folículos em desenvolvimento (primeiramente aparece em folículos primários, aumenta em folículos pré-antrais e antrais de tamanho  $\leq 4$  mm e desaparece gradualmente em folículos antrais de tamanho de 4-8 mm) (12, 15, 57). Ele tem sua expressão induzida por outras proteínas da superfamília TGF- $\beta$ , como BMP-2, -6, -7 (58).

As principais funções do AMH estão relacionadas com a seleção do folículo dominante, para isso ele está envolvido na regulação da ativação dos folículos primordiais e na inibição do crescimento destes folículos (59). Três mecanismos são sugeridos para essa ação: (i) interação direta com receptores para o AMH, o AMHR2, nas CG de folículos em estágios de desenvolvimento iniciais; (ii) de forma indireta, por diminuir a sinalização de fatores de crescimento que promovem a transição de folículo primordial a folículo primário (fator de crescimento de fibroblasto, kit ligante, fator de crescimento de queratinócitos), e (iii) por agir nas células ovarianas diminuindo a expressão dos receptores de ligação desses fatores de crescimento, o que diminui a responsividade das células a esses fatores (9).

Há envolvimento do AMH no ajuste fino da sensibilidade do folículo ao FSH. Na fase folicular do ciclo menstrual, o aumento do nível de FSH recruta uma coorte de folículos quiescentes para continuar o crescimento, no entanto, destes folículos recrutados apenas um seguirá se desenvolvendo, o folículo dominante, e ovulará. O processo de seleção do folículo para a dominância ainda não é bem esclarecido, porém sabe-se que o AMH diminui a sensibilidade dos folículos ao FSH, inibindo seu crescimento (59). O receptor *AMHR2* não é expresso em folículos antrais, fazendo com que o AMH não tenha efeito sobre estes e permitindo que o FSH promova o seu crescimento (60).

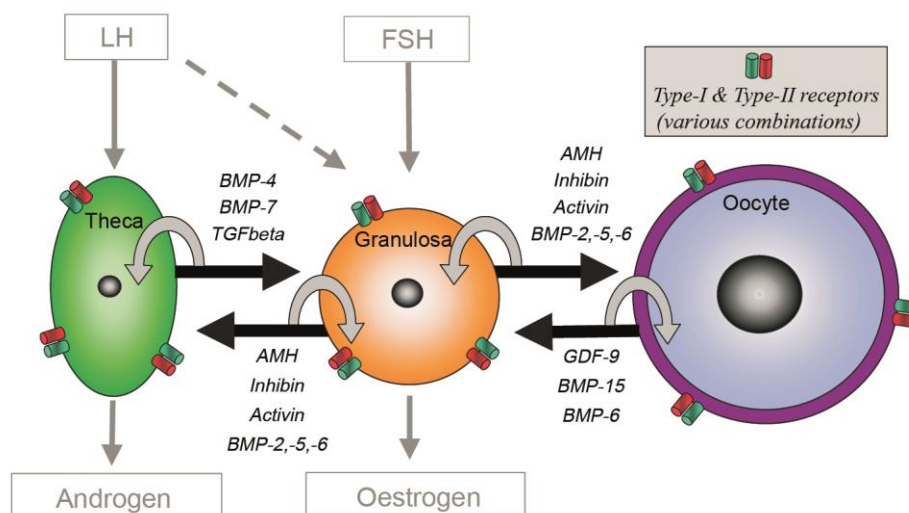
O AMH é detectável no soro humano e tem sido utilizado como preditor acurado e reprodutível para estimar reserva ovariana em mulheres com dificuldade para gestar (9). Essa medida é indireta uma vez que ele é expresso por folículos em crescimento

e não pelos folículos primordiais que compõem a reserva ovariana (12). Um estudo com mulheres submetidas à FIV mostrou que a concentração sérica de 0,2 ng/mL de AMH pode ser utilizada como ponto de corte para prever a qualidade da reserva ovariana, uma vez que mulheres com níveis abaixo de 0,2 ng/mL apresentaram menor Contagem de Folículos Antrais (teste realizado por ultrassonografia para predição da reserva ovariana) e menores taxas de gravidez clínica do que aquelas com níveis maiores do que este (61). Além disso, os níveis séricos de AMH diminuem com o avanço da idade ovariana (a idade ovariana avança à medida que decresce o estoque de folículos) tornando-se indetectáveis após a menopausa (57).

### BMPs e GDF-9

As BMPs aparecem em vários tecidos regulando crescimento, diferenciação e morte celular. Dentre as aproximadamente 20 BMPs descritas, várias são expressas no ovário e é bem conhecido seu papel de reguladoras positivas da especificação e proliferação de células germinativas primordiais no período embrionário de vários mamíferos (12). O GDF-9 é a principal proteína da subfamília de GDFs e apresenta papel essencial no desenvolvimento inicial dos folículos (4).

Cada compartimento do complexo oócito-folículo expressa diferentes fatores que permitem a comunicação bi-direcional oócito/CG e CG/CT, como é mostrado na Figura 3 (4).



**Figura 3.** Membros da superfamília TGF- $\beta$  envolvidos na comunicação entre o oócito e as células da granulosa e da teca. (Fonte: Knight et al., 2006)

BMP-6 é expressa pelas CG de folículos primordiais e primários e por oócitos de folículos antrais. Essa proteína promove a proliferação de CG em folículos antrais e diminui a produção de progesterona FSH-dependente por estas células, porém não influencia a produção de estradiol FSH-dependente, além de diminuir a produção de andrógenos pelas CT (4, 49). BMP-6 também contribui para a sobrevivência de folículos saudáveis em crescimento e auxilia na preservação da reserva ovariana pois aumenta a expressão do AMH (62).

BMP-15 (também conhecida como GDF-9b) e GDF-9 são proteínas secretadas pelo oócito dos folículos em estágio primário e secundário e tem sua origem em genes parálogos (genes que dão origem a proteínas de função semelhante) (4). O GDF-9 também é expresso em CG após o pico de LH o que revela a sua atividade em toda a foliculogênese (41, 63).

GDF-9 e BMP-15, assim como outros membros da superfamília TGF- $\beta$ , são sintetizados como pré-proteínas que após clivagem proteolítica formam homodímeros (GDF-9:GDF-9 e BMP-15:BMP-15) e heterodímeros (GDF-9:BMP-15). Em 2013, um estudo *in vitro* mostrou que o heterodímero GDF-9:BMP-15 é, em humanos, 1000 a 3000 vezes mais potente biologicamente que o homodímero BMP-15 e que, em ratos, o heterodímero é 10 a 30 vezes mais potente que o homodímero GDF-9, além disso este heterodímero apresenta via de sinalização diferente das vias utilizadas pelos homodímeros (64).

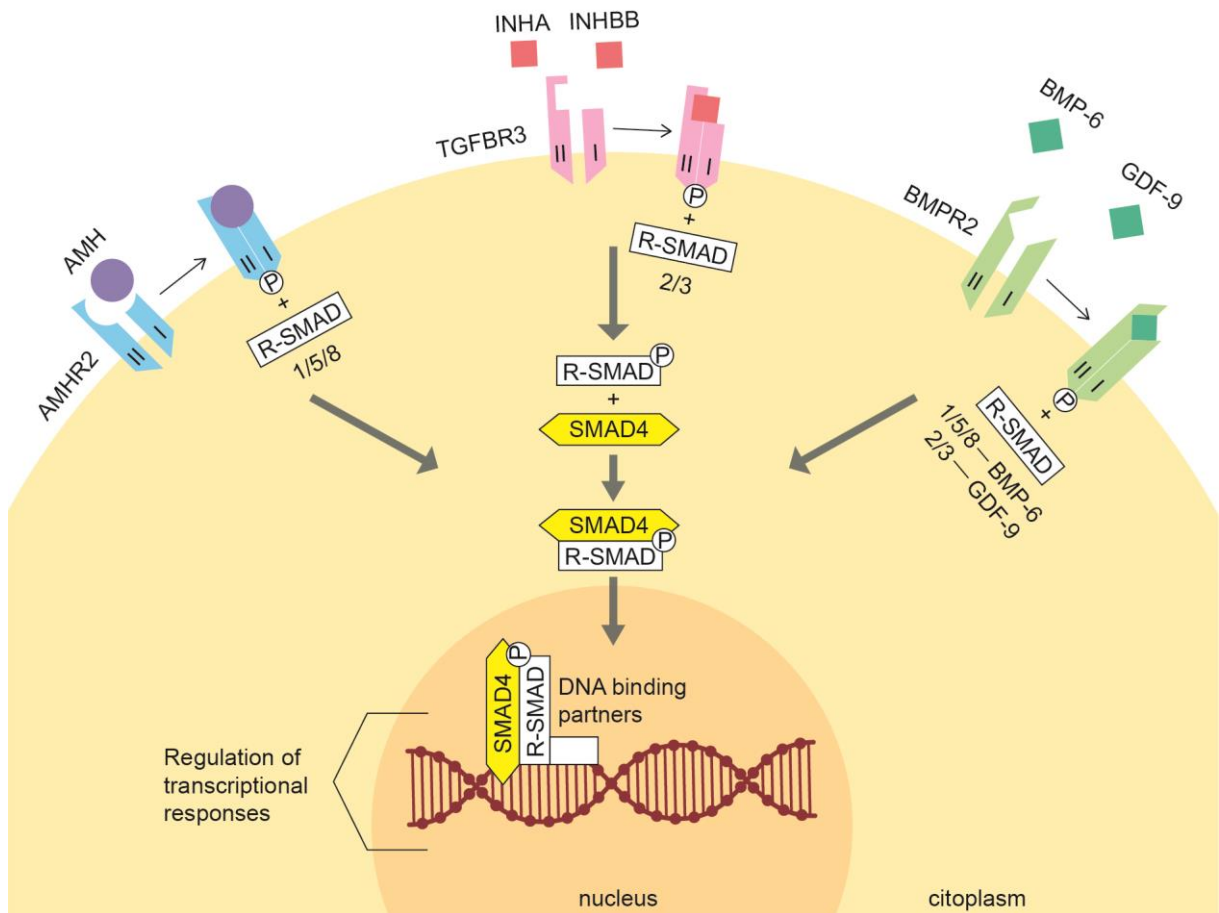
A principal função do GDF-9 e da BMP-15 é promover o avanço do folículo primário para o estágio de folículo secundário. Para isso, eles sinalizam a mitose de CG e CT no entorno do folículo primário. No folículo secundário, continuam estimulando a proliferação de CG, porém diminuem a produção de progesterona por estas células e aumentam a expansão e reorganização do cumulus para a formação do antro. Neste momento, o GDF-9 também estimula a expressão de receptores de FSH na superfície das CG do folículo pré-antral, que passa a ser responsivo à gonadotrofina (4, 9).

BMP-15 está associada ao aumento da expressão de *AMH* e do seu receptor *AMHR2*, potencializando as ações inibitórias de AMH (65). E o GDF-9, além das funções expostas anteriormente, está envolvido na regulação positiva da produção de inibina B pelas CG através da ativação da via SMAD2 (51), e também é responsável pela promoção da biossíntese de colesterol pelas células do cumulus momentos antes

da ovulação, o que permite o aporte adequado de precursores metabólicos ao oócito (66).

#### **2.4 Processamento dos ligantes, seus receptores e a sinalização**

A superfamília TGF- $\beta$  é formada por proteínas sintetizadas como pró-peptídeos que se tornam dímeros (homo ou heterodímeros) ligados por pontes dissulfeto após seu processamento (16, 67). A partir do momento em que passam a ser funcionais, esses fatores se ligam e ativam dois tipos de receptores transmembrana serina/treonina-quinase: inicialmente, ligam-se a um receptor tipo 2 que fosforila o receptor tipo I, responsável por iniciar a sinalização intracelular (16). O receptor tipo I ativado fosforila a proteína SMAD apropriada (específica para cada grupo de ligantes) que inicia uma cascata de sinalização intracelular. Há três categorias de proteínas SMAD: as ativadas por receptor (R-SMAD, SMADs 1, 2, 3, 5 e 8), a mediadora comum (Co-SMAD, SMAD4) e as inibitórias (I-SMAD, SMADs 6 e 7) (15). Os R-SMADs ativados formam complexos com o SMAD4 que é o Co-SMAD, esses complexos se deslocam do citoplasma para o núcleo onde se associam com a cromatina regulando a transcrição de inúmeros genes responsáveis pela proliferação e diferenciação celular (14, 15). A Figura 4 demonstra a via de sinalização SMAD utilizada por diversos membros da superfamília TGF- $\beta$ .



**Figura 4.** Esquema da sinalização intracelular via SMAD decorrente da ativação de receptores transmembrana por membros da superfamília TGF- $\beta$ .

A ruptura da comunicação ligante/receptor/sinalizador gera fenótipo de infertilidade e doença (68). Alterações genéticas de fatores em separado também têm consequência no fenótipo reprodutivo: a *BMP-6* parece estar envolvida na patogênese da SOP, pois aparece superexpressa nesse grupo de pacientes podendo induzir algum grau de resistência ao FSH (69); Kawabe et al. demonstraram que endometriose moderada à grave pode reduzir a expressão de *GDF-9* causando baixa maturação nuclear do oócito e pobre qualidade embrionária (41); a *BMP-15* tem mutações relacionadas a diferentes fenótipos reprodutivos e o alelo c.-9G foi relacionado à transcrição aumentada da proteína em pacientes com falência ovariana prematura, sendo indicado como agente causal desta doença (70); polimorfismos nos genes *GDF-9* também foram associados com falência ovariana prematura (71); e nós demonstramos que o alelo polimórfico do SNP (polimorfismo de nucleotídeo simples)

p.1le49Ser do *AMH* está associado com a infertilidade na endometriose (28). Dessa forma, fica clara a importância de compreender melhor o envolvimento da superfamília TGF- $\beta$  em doenças ginecológicas associadas com infertilidade.

## 2.5 Endometriose

A endometriose, por definição, é uma desordem ginecológica estrogênio-dependente caracterizada pela presença/disseminação de tecido glandular e estroma endometrial fora da cavidade uterina (17). Esta patologia pode ocorrer sem sinais ou sintomas, sendo diagnosticada, muitas vezes, em função da dificuldade ou incapacidade de gestar; ou de forma sintomática, cursando, principalmente, com dor pélvica cíclica ou crônica, dismenorreia, dispareunia e/ou infertilidade (72).

A endometriose é o resultado da interação entre diversos fatores (genéticos e ambientais) (17) e a história familiar é um dado importante a se considerar quando existe possibilidade de que o diagnóstico seja endometriose: mulheres com história familiar são afetadas sete vezes mais do que mulheres sem história familiar (73). Isso demonstra que há forte envolvimento hereditário e genético na doença. Com relação à composição genética da endometriose, sabe-se que há envolvimento dos cromossomos 7 e 10 (73), e genes específicos vêm sendo estudados com a popularização das técnicas de Biologia Molecular, como o polimorfismo do gene *DRD2* (receptor de dopamina) que está associado ao aumento da prolactina e foi referido como facilitador da implantação do endométrio ectópico por aumentar a prolactina e, conseqüentemente, seu efeito angiogênico (74).

Menstruação retrógrada, teoria aceita pela maioria dos pesquisadores para explicar a etiologia da doença, consiste no refluxo de tecido endometrial através das trompas de Falópio em direção à cavidade peritoneal (75); esse tecido pode se disseminar, implantar e crescer, pois apresenta capacidade de angiogênese, linfangiogênese e neurogênese, e são essas características que permitem o sucesso do implante ectópico, diante disso ocorre resposta imunológica e a geração dos sintomas relacionados à endometriose (76).

Os implantes endometrióticos podem ser de diversos tamanhos e se aderir em vários órgãos. O mais frequente é que o endométrio ectópico se instale na cavidade peritoneal e no entorno dos ovários, entretanto também já foi encontrado no pericárdio, na pleura, parênquima pulmonar e, raro, no cérebro. Diferentes tamanhos e localização dos implantes é que possibilitam que a doença apresente graus de

complexidade e gravidade. No entanto, é difícil classificar as pacientes que apresentam esta doença (77).

O sistema de classificação proposto pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (American Society for Reproductive Medicine - ASRM) em 1979 e revisado em 1996 categoriza a endometriose considerando tamanho, profundidade, localização dos implantes endometrióticos e gravidade das aderências: grau 1 (mínima – implantes isolados e sem aderências significativas), grau 2 (leve – implantes superficiais com menos de 5 cm, sem aderências significativas), grau 3 (moderada – múltiplos implantes, aderências peritubárias e periovarianas evidentes) e grau 4 (severa – múltiplos implantes superficiais e profundos, incluindo endometriomas e aderências densas e firmes) (78). Este sistema não correlaciona o grau de endometriose com a possibilidade de gravidez durante a fase e nem após o tratamento da doença (79).

Atualmente, a classificação mais utilizada apresenta a endometriose em três fenótipos: peritoneal, ovariana e profunda. Na endometriose peritoneal, observam-se lesões na superfície de órgãos da cavidade peritoneal, como intestino, bexiga e ureter; seus principais sintomas são cólica, irregularidade menstrual e infertilidade. A endometriose ovariana apresenta lesões na superfície externa do ovário que também aparecem como cistos ovarianos por provocarem retração para o interior do mesmo; normalmente cursa sem sintomas ou com sintomas discretos. A endometriose profunda influencia a fertilidade feminina e é a que apresenta maior número de sintomas e mais intensos: dor pélvica crônica, dispareunia, dismenorreia, queixas gastrointestinais; essa forma de endometriose apresenta implantes que envolvem intestino, septo reto-vaginal, bexiga, ureteres e ligamentos útero-sacos (80).

Com relação à epidemiologia, a endometriose afeta aproximadamente uma em cada sete mulheres em idade reprodutiva (17). O diagnóstico comumente é realizado por volta dos 30 anos de idade em mulheres com queixas de infertilidade e em torno dos 33 anos em mulheres que referem dor, sendo rara antes da menarca e pouco referida após a menopausa (81). Existe um atraso no diagnóstico de em média 13 anos, pois as pacientes normalmente pensam que a dismenorreia (cólica antes ou durante a menstruação) é normal e não buscam esclarecer a sua causa (19). Dentre a população feminina fértil, 0,5-5% das mulheres apresenta endometriose; com relação à população feminina infértil, a endometriose está presente em 25-40% (82). Estima-se que 50% das pacientes com endometriose sejam, ao menos, subférteis (18)

e a taxa de fecundidade de mulheres com endometriose não tratadas é menor do que a de casais normais (72). Apesar de estar bem estabelecida a relação entre endometriose e infertilidade, relacionar o grau da doença com o comprometimento da fertilidade ainda é um desafio.

A investigação da endometriose considera sintomas e sinais clínicos que levam à realização de laparoscopia com inspeção direta da cavidade e visualização dos implantes (não sendo necessária a confirmação histopatológica através de biópsia) para confirmação do diagnóstico. Esta técnica cirúrgica é considerada padrão-ouro para o diagnóstico, segundo consenso entre a Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (European Society of Human Reproduction and Embryology - ESHRE) (83) e a ASRM (78).

## **2.6 Endometriose e infertilidade**

A endometriose causa decréscimo de fertilidade ou até mesmo infertilidade nas mulheres. A taxa de fecundidade de um casal saudável é de 15 a 20% por mês; em um casal cuja mulher é acometida pela endometriose essa taxa cai para 2 a 10% (84). Apesar de a associação entre endometriose e infertilidade estar bem sedimentada na literatura, ainda são escassas as informações que expliquem de forma clara esse envolvimento.

Uma evidência é a distorção anatômica que os implantes endometrióticos podem causar no sistema reprodutivo feminino ocasionando impedimento físico da chegada tanto do oócito quanto dos espermatozóides ao local ideal da fertilização e, no caso de ocorrer fertilização, esses implantes podem prejudicar o transporte do embrião ao local de nidação (22).

A inflamação decorrente da endometriose na cavidade peritoneal altera a ovulação e influencia negativamente a produção de oócitos pelo ovário. Essa inflamação também prejudica a qualidade e a funcionalidade do esperma em função da maior quantidade de macrófagos ativados (22). Além disso, na endometriose ocorre insuficiência da fase lútea (23) com níveis diminuídos de progesterona (24) e isso influencia a receptividade endometrial ao embrião (22, 25), como nosso grupo de pesquisa já mencionara. Foi sugerido que há uma comunicação bidirecional entre o endométrio ectópico e o endométrio eutópico alterando a polaridade do endométrio eutópico requerida para a fertilidade normal (22, 85).



A alteração de vários genes está presente na endometriose e afeta a fertilidade. Um desses é o gene *Hoxa10* e o pico da sua expressão ocorre durante a janela de implantação em resposta ao estímulo do estrogênio e da progesterona, este gene é importante para a regeneração do endométrio após o evento menstrual. Mulheres inférteis com endometriose apresentam expressão diminuída deste gene e, conseqüentemente, a receptividade do seu endométrio é menor refletindo negativamente na taxa de implantação (26).

Outras alterações genéticas também estão presentes na endometriose, como o polimorfismo genético do receptor de LH (*LHR*), que consiste na inserção de 6 pares de bases (CTGCAG) no códon 18 do exon 1 do gene, que foi relacionado com infertilidade associada à endometriose evidenciando disfunção ovulatória nesta doença (27); e a associação do alelo polimórfico do gene *AMH* para o polimorfismo p.Ile49Ser com o grupo de pacientes inférteis com endometriose, achado este que reforça a hipótese da presença de anormalidades de células da granulosa na endometriose e aumenta o questionamento acerca do envolvimento da superfamília TGF- $\beta$  com esta doença (28). Esses achados compõem estudos do nosso grupo de pesquisa e essa linha de pesquisa foi desenvolvida justamente para tentar entender melhor qual sinalização hormonal pode estar associada com a infertilidade em mulheres que apresentam endometriose.

A fim de preservar/restaurar a fertilidade da mulher com endometriose que deseja gestar são realizados determinados procedimentos dependendo do grau de comprometimento do sistema reprodutivo. Remover os implantes endometrióticos por meio cirúrgico é a base do manejo e apresenta resultado positivo em todos os estágios da doença por corrigir a anatomia pélvica. Em seguida, duas técnicas de reprodução assistida podem ser utilizadas: superovulação com inseminação intrauterina para formas mais amenas da doença e fertilização *in vitro* (FIV) com transferência embrionária para casos mais complexos que envolvem dano tubário (20, 21).

## **2.7 Superfamília TGF- $\beta$ e endometriose**

Membros da superfamília TGF- $\beta$  são expressos no endométrio em condições fisiológicas e patológicas, por isso começaram a ser estudados como moléculas potenciais no estabelecimento e na manutenção da endometriose (31).

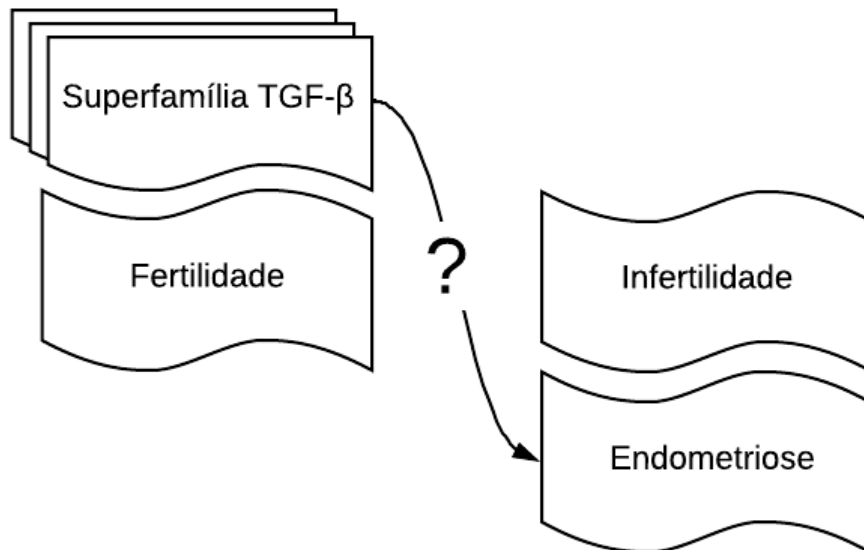
A ativina A é produzida na endometriose ovariana e foi relatada a sua influência na expressão da aromatase P450 promovendo a síntese de estrogênio, o que cria

condições para a sobrevivência e o desenvolvimento da lesão ectópica (32, 33); *AMH* e seu receptor *AMHR2* aparecem aumentados no endométrio de mulheres com endometriose e são expressos em lesões endometrióticas (34); *TGFβ1*, *SMAD1* e *SMAD4* estão supra-regulados no endométrio eutópico de pacientes com endometriose (35); *TGFβ1* é sintetizado em células de endometrioma tornando possível a fibrose e a sua adesão ao tecido ovariano (36, 37, 38); *BMP-6* também está expressa no endométrio ectópico contribuindo para os mecanismos de fixação, sobrevivência e expansão da endometriose (39).

Estudos associando a endometriose e membros da superfamília TGF-β vêm sendo realizados no sentido de conhecer melhor a patogênese da doença. Entretanto, apesar de estar estabelecido que existem anormalidades funcionais nas células da granulosa dessas mulheres (23, 24, 29, 30), poucos trabalhos exploraram essas proteínas como influenciadoras da fertilidade na endometriose, a exemplo de Hendarto et al. que demonstraram que mulheres com endometriose apresentam menor concentração de GDF-9 no fluido folicular (40), Kawabe et al. que relataram expressão diminuída de *GDF-9* na endometriose moderada a severa (41) e De Conto et al. que mostraram a associação do genótipo polimórfico do *AMH* em pacientes inférteis com endometriose (28). Mais estudos são necessários nessa área, pois conhecer melhor o comportamento das proteínas da superfamília TGF-β na infertilidade associada à endometriose pode levar ao desenvolvimento de terapias personalizadas e mais eficientes para esse grupo de pacientes inférteis.

### 3 MARCO CONCEITUAL

É bem estabelecida a relação de endometriose e infertilidade, da mesma forma, está bem sedimentado o conhecimento acerca do envolvimento da Superfamília TGF- $\beta$  nos processos de fertilidade. Nós demonstramos que existem anormalidades funcionais nas células da granulosa de mulheres inférteis com endometriose e que o *hormônio anti-Mulleriano*, membro da Superfamília TGF- $\beta$ , apresenta polimorfismo genético nesse grupo de pacientes. Esses são os marcos conceituais que levam a questionar se há alteração na expressão de membros da Superfamília TGF- $\beta$  na infertilidade associada à endometriose.



#### 4 OBJETIVOS

Analisar a expressão gênica dos ligantes *BMP-6*, *GDF-9*, *AMH*, *TGF $\beta$ 3*, *INHBB*, *INHA*; receptores *BMPR2*, *AMHR2*, *TGF $\beta$ R3*; e sinalizadores intracelulares *SMAD3* e *SMAD4* da superfamília TGF- $\beta$  em células da granulosa de folículos ovarianos antrais de mulheres inférteis com endometriose submetidas à fertilização *in vitro* comparando-a com a expressão destes genes em células da granulosa de folículos antrais de mulheres submetidas à fertilização *in vitro* por fator tubário ou fator masculino.

## 5 HIPÓTESE NULA

A expressão dos genes *BMP-6*, *GDF-9*, *AMH*, *TGF $\beta$ 3*, *INHBB*, *INHA*, *BMPR2*, *AMHR2*, *TGF $\beta$ R3*, *SMAD3* e *SMAD4* em células da granulosa de folículos antrais de mulheres inférteis com endometriose submetidas à fertilização *in vitro* não difere da expressão destes genes em células da granulosa de folículos antrais de mulheres submetidas à fertilização *in vitro* por fator tubário ou fator masculino.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – De Felici M, Klinger FG, Farini D, Scaldaferrri ML, Iona S, Lobascio M. Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death. *Reprod Biomed Online*. 2005 Feb;10(2):182-91.
- 2 – Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod*. 1986 Feb;1(2):81-7.
- 3 – Juengel JL, McNatty KP. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update*. 2005 Mar-Apr;11(2):143-60.
- 4 – Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 2006 Aug;132(2):191-206.
- 5 – Chang HM, Qiao J, Leung PC. Oocyte-somatic cell interactions in the human ovary- novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Hum Reprod Update*. 2016 Dec;23(1):1-18.
- 6 – Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N. Ovarian Folliculogenesis. *Results Probl Cell Differ*. 2016;58:167-90.
- 7 – Homburg R, Crawford G. The role of AMH in anovulation associated with PCOS: a hypothesis. *Hum Reprod*. 2014;29(6):1117-21.
- 8 – Kim JW, Kang KM, Yoon TK, Shim SH, Lee WS. Study of circulating hepcidin in association with iron excess, metabolic syndrome, and BMP-6 expression in granulosa cells in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2014;102(2):548-554.e2.
- 9 – Trombly DJ, Woodruff TK, Mayo KE. Roles for transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis. *Semin Reprod Med*. 2009 Jan;27(1):14-23.
- 10 – Da Broi MG, Giorgi VSI, Wang F, Keefe DL, Albertini D, Navarro PA. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(5):735-751.
- 11 – Walton KL, Makanji Y, Robertson DM, Harrison CA. The synthesis and secretion of inhibins. *Vitam Horm*. 2011;85:149-84.

- 12 – Pangas SA. Regulation of the ovarian reserve by members of the transforming growth factor beta family. *Mol Reprod Dev.* 2012 Oct;79(10):666-79.
- 13 – Liang N, Xu Y, Yin Y, Yao G, Tian H, Wang G, Lian J, Wang Y, Sun F. Steroidogenic factor-1 is required for TGF-beta3-mediated 17beta-estradiol synthesis in mouse ovarian granulosa cells. *Endocrinology.* 2011;152(8):3213-25.
- 14 – Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113(6):685-700.
- 15 – Wrana JL. Signaling by the TGF $\beta$  superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(10):a011197.
- 16 – Kristensen SG, Andersen K, Clement CA, Franks S, Hardy K, Andersen CY. Expression of TGF-beta superfamily growth factors, their receptors, the associated SMADs and antagonists in five isolated size-matched populations of pre-antral follicles from normal human ovaries. *Mol Hum Reprod.* 2014;20(4):293-308.
- 17 – Begum T, Chowdhury SR. Aetiology and pathogenesis of endometriosis - a review. *Mymensingh Med J.* 2013 Jan; 22(1):218-21.
- 18 – Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S, Borini A. Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2010; 27:441-7.
- 19 – Han XT, Guo HY, Kong DL, Han JS, Zhang LF. Analysis of characteristics and influence factors of diagnostic delay of endometriosis. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2018 Feb 25;53(2):92-98.
- 20 – Olive DL, Lindheim SR, Pritts EA. Endometriosis and infertility: what do we do for each stage? *Curr Womens Health Rep.* 2003 Oct;3(5):389-94.
- 21 – Ozkan S, Murk W, Arici A. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Apr;1127:92-100.
- 22 – Macer ML, Taylor HS. Endometriosis and Infertility A Review of the Pathogenesis and Treatment of Endometriosis-associated Infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2012 Dec;39(4):535-49.
- 23 – Cunha-Filho JS, Gross JL, Lemos NA, Brandelli A, Castillos M, Passos EP. Hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients with mild and minimal endometriosis. *Horm Metab Res.* 2001 Apr;33(4):216-20.

- 24 – Cunha-Filho JS, Gross JL, Bastos de Souza CA, Lemos NA, Giugliani C, Freitas F, Passos EP. Physiopathological aspects of corpus luteum defect in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *J Assist Reprod Genet.* 2003 Mar;20(3):117-21.
- 25 – Lessey BA, Kim JJ. Endometrial receptivity in the eutopic endometrium of women with endometriosis: it is affected, and let me show you why. *Fertil Steril.* 2017 Jul;108(1):19-27.
- 26 – Zanatta A, Rocha AM, Carvalho FM, Pereira RM, Taylor HS, Motta EL, Baracat EC, Serafini PC. The role of the Hoxa10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis and its related infertility: a review. *J Assist Reprod Genet.* 2010 Dec;27(12):701-10.
- 27 – Schmitz CR, de Conto E, Genro VK, de Souza CAB, Matte U, Cunha-Filho JS. A common lh receptor polymorphism is associated to infertility and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril.* 2013 Sep;100(3), Supplement, Page S23
- 28 – De Conto E, Matte Ú, Bilibio JP, Genro VK, Souza CA, Leão DP, Cunha-Filho JS. Endometriosis-associated infertility: GDF-9, AMH, and AMHR2 genes polymorphisms. *J Assist Reprod Genet.* 2017;34(12):1667-1672.
- 29 – Harlow CR, Cahill DJ, Maile LA, Talbot WM, Mears J, Wardle PG, Hull MG. Reduced preovulatory granulosa cell steroidogenesis in women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(1):426-9.
- 30 – Sanchez AM, Somigliana E, Vercellini P, Pagliardini L, Candiani M, Vigano P. Endometriosis as a detrimental condition for granulosa cell steroidogenesis and development: From molecular alterations to clinical impact. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;155(Pt A):35-46.
- 31 – Dela Cruz C, Reis FM. The role of TGF $\beta$  superfamily members in the pathophysiology of endometriosis. *Gynecol Endocrinol.* 2015 Jul;31(7):511-5.
- 32 – Mabuchi Y, Yamoto M, Minami S, Umesaki N. Immunohistochemical localization of inhibin and activin subunits, activin receptors and Smads in ovarian endometriosis. *Int J Mol Med.* 2010 Jan;25(1):17-23.
- 33 – Zheng J, Qu J, Lu P, Hou Z, Cui Y, Mao Y, Qi X, Ji H, Liu J. Activin A Stimulates Aromatase via the ALK4-Smad Pathway in Endometriosis. *Biomed Res Int.* 2016;2016:5791510. Epub 2016 Oct 19.



- 34 – Carrarelli P, Rocha AL, Belmonte G, Zupi E, Abrão MS4, Arcuri F, Piomboni P, Petraglia F. Increased expression of antimüllerian hormone and its receptor in endometriosis. *Fertil Steril*. 2014 May;101(5):1353-8.
- 35 – Ping S, Ma C, Liu P, Yang L, Yang X, Wu Q, Zhao X, Gong B. Molecular mechanisms underlying endometriosis pathogenesis revealed by bioinformatics analysis of microarray data. *Arch Gynecol Obstet*. 2016 Apr;293(4):797-804.
- 36 – Correa LF, Zheng Y, Delaney AA, Khan Z, Shenoy CC, Daftary GS. TGF- $\beta$  Induces Endometriotic Progression via a Noncanonical, KLF11-Mediated Mechanism. *Endocrinology*. 2016 Sep;157(9):3332-43.
- 37 – Shi LB, Zhou F, Zhu HY, Huang D, Jin XY, Li C, Dai Y, Pan YB, Zhang SY. Transforming growth factor beta1 from endometriomas promotes fibrosis in surrounding ovarian tissues via Smad2/3 signaling. *Biol Reprod*. 2017 Jan 1;97(6):873-882.
- 38 – Lin X, Dai Y, Xu W, Shi L, Jin X, Li C, Zhou F, Pan Y, Zhang Y, Lin X, Zhang S. Hypoxia Promotes Ectopic Adhesion Ability of Endometrial Stromal Cells via TGF- $\beta$ 1/Smad Signaling in Endometriosis. *Endocrinology*. 2018 Apr 1;159(4):1630-1641.
- 39 – Athanasios F, Afrodite N, Effstratios P, Demetrios K. Co-expression of bone morphogenetic protein 6 with estrogen receptor  $\alpha$  in endometriosis. *Arch Gynecol Obstet*. 2012 Apr;285(4):1001-7.
- 40 – Hendarto H, Prabowo P, Moeloek FA, Soetjipto S. Growth differentiation factor 9 concentration in the follicular fluid of infertile women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2010 Jul;94(2):758-60.
- 41 – Kawabe S, Yamashita Y, Saito N, Kokunai K, Hayashi A, Hayashi M, Terai Y, Miyazaki K, Ohmichi M. The effect of moderate to severe endometriosis on expression of growth differentiation factor-9 mRNA in human granulosa cells under controlled ovarian hyperstimulation. *Reprod Med Biol*. 2015 May 19;14(4):179-184.
- 42 – Hutt KJ, Albertini DF. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod Biomed Online*. 2007 Jun;14(6):758-64.
- 43 – Craig J, Orisaka M, Wang H, Orisaka S, Thompson W, Zhu C, Kotsuji F, Tsang BK. Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. *Front Biosci*. 2007 May 1;12:3628-39.

- 44 – Kidder GM, Vanderhyden BC. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010 Apr;88(4):399-413.
- 45 – Hinck AP. Structural studies of the TGF- $\beta$ s and their receptors - insights into evolution of the TGF- $\beta$  superfamily. *FEBS Lett*. 2012 Jul 4;586(14):1860-70.
- 46 – Chu YL, Xu YR, Yang WX, Sun Y. The role of FSH and TGF- $\beta$  superfamily in follicle atresia. *Aging (Albany NY)*. 2018 Mar 2;10(3):305-321.
- 47 – Liu X, Andoh K, Abe Y, Kobayashi J, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. A comparative study on transforming growth factor-beta and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice. *Endocrinology*. 1999 Jun;140(6):2480-5.
- 48 – Dodson WC, Schomberg DW. The effect of transforming growth factor-beta on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 1987 Feb;120(2):512-6.
- 49 – Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Cell Endocrinol*. 2002 May 31;191(1):35-43.
- 50 – Chen YC, Chang HM, Cheng JC, Tsai HD, Wu CH, Leung PC. Transforming growth factor- $\beta$ 1 up-regulates connexin43 expression in human granulosa cells. *Hum Reprod*. 2015 Sep;30(9):2190-201.
- 51 – Kaivo-Oja N, Bondestam J, Kämäräinen M, Koskimies J, Vitt U, Cranfield M, Vuojolainen K, Kallio JP, Olkkonen VM, Hayashi M, Moustakas A, Groome NP, ten Dijke P, Hsueh AJ, Ritvos O. Growth differentiation factor-9 induces Smad2 activation and inhibin B production in cultured human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Feb;88(2):755-62.
- 52 – Martins da Silva SJ, Bayne RA, Cambray N, Hartley PS, McNeilly AS, Anderson RA. Expression of activin subunits and receptors in the developing human ovary: activin A promotes germ cell survival and proliferation before primordial follicle formation. *Dev Biol*. 2004 Feb 15;266(2):334-45.
- 53 – Fang L, Chang HM, Cheng JC, Leung PC, Sun YP. TGF- $\beta$ 1 downregulates StAR expression and decreases progesterone production through Smad3 and ERK1/2

signaling pathways in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Nov;99(11):E2234-43.

54 – Chang HM, Cheng JC, Huang HF, Shi FT, Leung PC. Activin A, B and AB decrease progesterone production by down-regulating StAR in human granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Sep 5;412:290-301.

55 – Wijayarathna R, de Kretser DM. Activins in reproductive biology and beyond. *Hum Reprod Update.* 2016 Apr;22(3).

56 – Dokras A, Habana A, Giraldo J, Jones E. Secretion of inhibin B during ovarian stimulation is decreased in infertile women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2000 Jul;74(1):35-40.

57 – Themmen AP. Anti-Müllerian hormone: its role in follicular growth initiation and survival and as an ovarian reserve marker. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2005;(34):18-21.

58 – Ogura-Nose S, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Hiroi H, Yano T, Taketani Y. Anti-Müllerian hormone (AMH) is induced by bone morphogenetic protein (BMP) cytokines in human granulosa cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012 Sep;164(1):44-7.

59 – Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction.* 2002 Nov;124(5):601-9.

60 – Visser JA, Durlinger AL, Peters IJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, de Jong FH, Themmen AP. Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Müllerian hormone null mice. *Endocrinology.* 2007 May;148(5):2301-8.

61 – Merhi Z, Zapantis A, Berger DS, Jindal SK. Determining an anti-müllerian hormone cutoff level to predict clinical pregnancy following in vitro fertilization in women with severely diminished ovarian reserve. *J Assist Reprod Genet.* 2013 Aug 21. In press.

62 – Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yano T, Nishii O, Taketani Y. Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin beta subunits, and anti-Müllerian hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 2009 Nov;92(5):1794-8.

- 63 – Yamamoto N, Christenson LK, McAllister JM, Strauss JF. Growth differentiation factor-9 inhibits 3'5'-adenosine monophosphate-stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jun;87(6):2849-56.
- 64 – Peng J, Li Q, Wigglesworth K, Rangarajan A, Kattamuri C, Peterson RT, Eppig JJ, Thompson TB, Matzuk MM. Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Feb 19;110(8):E776-85.
- 65 – Pierre A, Estienne A, Racine C, Picard JY, Fanchin R, Lahoz B, Alabart JL, Folch J, Jarrier P, Fabre S, Monniaux D, di Clemente N. The Bone Morphogenetic Protein 15 Up-Regulates the Anti-Müllerian Hormone Receptor Expression in Granulosa Cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Jun;101(6):2602-11.
- 66 – Otsuka F, McTavish KJ, Shimasaki S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol Reprod Dev.* 2011 Jan;78(1):9-21
- 67 – Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol.* 1999 Jun;13(6):1035-48.
- 68 – Li X, Tripurani SK, James R, Pangas SA. Minimal fertility defects in mice deficient in oocyte-expressed Smad4. *Biol Reprod.* 2012 Jan 30;86(1):1-6.
- 69 – Khalaf M, Morera J, Bourret A, Reznik Y, Denoual C, Herlicoviez M, Mittre H, Benhaim A. BMP system expression in GCs from polycystic ovary syndrome women and the in vitro effects of BMP4, BMP6, and BMP7 on GC steroidogenesis. *Eur J Endocrinol.* 2013 Feb 20;168(3):437-44.
- 70 – Fonseca DJ, Ortega-Recalde O, Esteban-Perez C, Moreno-Ortiz H, Patiño LC, Bermúdez OM, Ortiz AM, Restrepo CM, Lucena E, Laissue P. BMP15 c.-9C>G promoter sequence variant may contribute to the cause of non-syndromic premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online.* 2014 Nov;29(5):627-33.
- 71 – Ma L, Chen Y, Mei S, Liu C, Ma X, Li Y, Jiang Y, Ha L, Xu X. Single nucleotide polymorphisms in premature ovarian failure-associated genes in a Chinese Hui population. *Mol Med Rep.* 2015 Aug;12(2):2529-38.
- 72 – Bedoschi G, Turan V, Oktay K. Fertility preservation options in women with endometriosis. *Minerva Ginecol.* 2013 Apr;65(2):99-103.

- 73 – Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med*. 2009 Jan 15;360(3):268-79.
- 74 – Bilibio JP, Matte U, de Conto E, Genro VK, Souza CA, Cunha-Filho JS. Dopamine receptor D2 genotype (3438) is associated with moderate/severe endometriosis in infertile women in Brazil. *Fertil Steril*. 2013 Apr;99(5):1340-5.
- 75 – Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004 Nov 13-19;364(9447):1789-99.
- 76 – Hey-Cunningham AJ, Peters KM, Zevallos HB, Berbic M, Markham R, Fraser IS. Angiogenesis, lymphangiogenesis and neurogenesis in endometriosis. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013 Jun 1;5:1033-56.
- 77 – Krikun G. Endometriosis, Angiogenesis and Tissue Factor. *Scientifica*. Volume 2012, Article ID 306830, 10 pages.
- 78 – American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997 May 5;67(5):817-21.
- 79 – Guzick DS, Silliman NP, Adamson GD, Buttram Jr VC, Canis M, Malinak LR, Schenken RS. Prediction of pregnancy in infertile women based on the American Society for Reproductive Medicine's revised classification of endometriosis. *Fertil Steril*. 1997 May;67(5):822-9.
- 80 – Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril*. 1997 Oct;68(4):585-96.
- 81 – Bellelis P, Dias Jr JA, Podgaec S, Gonzales M, Baracat EC, Abrão MS. Aspectos epidemiológicos e clínicos da endometriose pélvica - uma série de casos. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56(4):467-71.
- 82 – Harb H, Gallos I, Chu J, Harb M, Coomarasamy A. The effect of endometriosis on in vitro fertilisation outcome: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*. 2013 Oct;120(11):1308-20.
- 83 – Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E; ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod*. 2005 Oct;20(10):2698-704.

84 – American Society for Reproductive Medicine. Endometriosis and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012 Sep;98(3):591-8.

85 – Santamaria X, Massasa EE, Taylor HS. Migration of cells from experimental endometriosis to the uterine endometrium. *Endocrinology*. 2012 Nov;153(11):5566-74.

## 7 ARTIGO

O artigo intitulado “*BMP-6* and *SMAD4* gene expression are altered in women with endometriosis-associated infertility.” foi submetido para publicação na revista JCEM (The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism) em junho de 2018.

**Title**

*BMP-6* and *SMAD4* gene expression are altered in women with endometriosis-associated infertility.

**Authors**

Emily De Conto

- Institutions: 1,2
- e-mail address: emilydconto@gmail.com
- Appropriate funding information for each author: CAPES, FIPE

Ursula Matte

- Institutions: 2
- e-mail address: umatte@hcpa.edu.br

João Sabino Cunha-Filho

- Institutions: 1,3
- e-mail address: sabino@insemine.com
- Appropriate funding information for each author: CNPq, FIPE

**Institutions**

1 - UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Paulo Gama, 110, Porto Alegre, RS, CEP 90.040-060, Brazil.

2 - HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2.350, Porto Alegre, RS, CEP 90.035-903, Brazil.

3 - Insemine Human Reproduction Center - Av Nilo Peçanha, 2825/905, Porto Alegre, RS, CEP 91330-001, Brazil.

**Short title**

*BMP-6* and *SMAD4* in women with endometriosis.

**Keywords**

Endometriosis - Infertility - Gene Expression - TGF- $\beta$  Superfamily - SMAD4 - BMP-6



**Corresponding author's contact information**

Emily De Conto

emilydconto@gmail.com

Adress: Rua Ramiro Barcelos, 2.350, Porto Alegre, RS, CEP 90.035-903, Brazil.

**Any grants or fellowships supporting the writing of the paper.**

CNPq, CAPES, FINE-HCPA, CAPES Doctoral Scholarship.

**Disclosure summary.**

I certify that neither I nor my co-authors have a conflict of interest as described above that is relevant to the subject matter or materials included in this Work.

## **Abstract**

### **Context**

Oocyte quality depends on communication between the oocyte and the granulosa and theca cells. In the preantral phase, the members of the TGF- $\beta$  superfamily are responsible for this communication and playing an important role in folliculogenesis and oogenesis. Members of the TGF- $\beta$  superfamily are related to endometriosis because they are expressed in the ectopic endometrium, but few studies have explored these proteins as influencing fertility in this disease. Considering these factors and to better understand the role of the TGF- $\beta$  superfamily in the antral phase in patients with endometriosis, this work investigated the gene expression of the ligands *AMH*, *BMP-6*, *GDF-9*, *INHA*, *INHBB* and *TGF $\beta$ 3*, receptors *AMHR2*, *BMPR2* and *TGF $\beta$ 3R3*, and intracellular signaling *SMAD3* and *SMAD4*.

### **Design**

Case-control study to evaluate the expression of TGF- $\beta$  superfamily members in infertile women with endometriosis comparing them with women undergoing *in vitro* fertilization due to tubal or male infertility through real-time PCR with TaqMan probes.

### **Results**

Age and outcomes of assisted reproduction were similar between the groups. Gene expression analysis demonstrated that *BMP-6* with Relative Quantification (RQ) of 0.431 ( $P=0.013$ ) and *SMAD4* with RQ of 0.624 ( $P=0.044$ ), indicating decreased expression levels in patients with endometriosis compared to the control group. The other genes did not display significant differences between the groups.

### **Conclusions**

The patients with endometriosis showed reduced expression of *BMP-6* and *SMAD4*, indicating that oocyte development could be altered in these patients, in regard to BMP-6 functions, and that all SMAD4 signaling pathways there should be impaired.

## Introduction

Communication between the oocyte and follicle cells ultimately determines the quality of the oocyte to be fertilized and the superfamily of growth factors and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is closely related to this process, since it governs this communication (1, 2) in the preantral and antral phases, along with follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) (3).

The major intraovarian factors of the TGF- $\beta$  superfamily are bone morphogenetic proteins (BMPs), growth and differentiation factors (GDFs), anti-Mullerian hormone (AMH), transforming growth factors  $\beta$  (TGF $\beta$ s), inhibins and activins (4). Among them, we highlight the following: AMH, which is related to the selection of the dominant follicle since it limits the growth of preantral and antral follicles by regulating their sensitivity to FSH (5); BMP-6, which contributes to the survival of healthy growing follicles and suppresses the depletion of the reserve of primordial follicles (6); and BMP-15 and GDF-9, which act in an analogous manner, inducing the proliferation, differentiation, apoptosis and luteinization of granulosa and theca cells in primary and secondary follicles (7).

Moreover, GDF-9 stimulates the expression of surface FSH receptors of these cells that respond to gonadotrophins (8); inhibin A (INHA) and inhibin B (INHBB) (9,10), and TGF $\beta$ 3, which induces the synthesis of estradiol in granulosa cells (11).

These proteins act on the granulosa and oocyte cells by binding to transmembrane receptors (AMHR2 for AMH; BMPR2 for BMP-6 and GDF-9, and TGF $\beta$ R3 for INHA and INHBB), which, once activated, phosphorylate R-SMAD proteins, specific for each group of ligands, and these complexes with SMAD4 (common mediator) move from the cytoplasm to the nucleus, regulating the transcription of innumerable genes responsible for cell proliferation and differentiation (12, 13, 14). Any change in the formation of the protein, its receptor or intracellular signaling can lead to loss of function and impairment in processes important for full development of the oocyte.

TGF- $\beta$  superfamily members have been studied in the search for understanding the pathogenesis of endometriosis (15): activin A creates conditions for survival and development of ectopic lesions (16, 17); AMH and its receptor AMHR2 are expressed in endometriotic lesions (18); TGF $\beta$ 1, SMAD1 and SMAD4 are over-regulated in the eutopic endometrium of patients with endometriosis (19); TGF $\beta$ 1 is synthesized by the

endometrium and promotes its attachment to ovarian tissue (20, 21, 22); *BMP-6* is expressed in the ectopic endometrium, contributing to the development and spread of endometriosis (23). However, few studies have explored these proteins as a reason for infertility associated with endometriosis or the effect of these proteins in granulosa cells.

Functional abnormalities in the granulosa cells of women with endometriosis are reported in the literature: luteal insufficiency (24, 25), impaired follicular steroidogenesis (26, 27), reduced P450 aromatase expression, increased generation of intracellular reactive oxygen species, and increased apoptotic signs (27).

We have recently shown that the genetic polymorphism of *AMH* p.Ile49Ser can influence fertility in endometriosis (28), thus demonstrating DNA alteration in a member of the TGF- $\beta$  superfamily in endometriosis. Based on the knowledge available so far, we considered it important to investigate the gene expression of some prominent members of the TGF- $\beta$  superfamily expressed in the antral phase of follicular development (*AMH*, *BMP-6*, *GDF-9*, *INHA*, *INHBB* and *TGF $\beta$ 3*) in the pathophysiology of endometriosis, along with its receptors (*AMHR2*, *BMPR2* and *TGF $\beta$ R3*) and intracellular signal transducers (*SMAD3* and *SMAD4*).

## Materials and Methods

### Study design

A case-control study was performed to evaluate the gene expression of TGF- $\beta$  superfamily members (ligands – *AMP*, *BMP-6*, *GDF-9*, *INHA*, *INHBB* and *TGF $\beta$ 3*, receptors – *AMHR2*, *BMPR2* and *TGF $\beta$ R3*; and signal transducers – *SMAD3* and *SMAD4*) in infertile women with endometriosis, comparing them with women undergoing *in vitro* fertilization (IVF) for tubal or male infertility. Patient recruitment and granulosa cell collection were performed at the INSEMINE Center of Human Reproduction, and the gene expression work was performed at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), both located in Porto Alegre, Brazil. This study is in accordance with STROBE guidelines for case-control studies.

### Patients

Patient eligibility criteria for both groups were: women aged 25-38 years, regular menstrual cycles, ultrasound for screening for negative endometriosis, and presence of both ovaries, submitted to IVF.

Inclusion criteria for the control group were: women submitted to IVF due to tubal or male factor as cause of infertility of the couple, and who did not have endometriosis diagnosed by laparoscopy, not used medication for pain, dysmenorrhea, or family history of endometriosis.

Inclusion criteria for the study group were: infertile women submitted to IVF with peritoneal endometriosis as the sole cause of infertility of the couple. Endometriosis was diagnosed by laparoscopy and the inclusion of only peritoneal endometriosis was intended to increase the homogeneity of the group.

Based on these criteria, twenty-eight women submitted to IVF at the INSEMINE Center of Human Reproduction were recruited for this study; eighteen were part of the Control group, and ten formed the Endometriosis group.

### Controlled ovarian hyperstimulation

Controlled ovarian hyperstimulation was performed with recombinant human FSH (Puregon, Vetter Pharma-Fertigung GmbH & Co. KG, Germany) and suppression of the GnRH antagonist pituitary gland (Orgalutran, Vetter Pharma-Fertigung GmbH & Co. KG, fixed protocol for six days. The daily dose of FSH was adjusted as of the sixth

day according to the number of growing follicles visualized by ultrasonography. In the last days of controlled ovarian hyperstimulation, ultrasonography was performed daily and ovarian induction lasted until at least three follicles had a diameter of 17 mm, at which time human chorionic gonadotropin (hCG) (Choriomon-M, IBSA Institut Biochimique SA, Switzerland) was administered to promote final follicle maturation, and aspiration was performed 36 hours later with ultrasonographic guidance.

### **Collection of granulosa cells**

The antral follicles were punctured as standard IVF protocol and the granulosa cells were collected from patients who had at least four oocytes recovered. The collection of the granulosa cells was performed mechanically with 22G needles, and these cells were then washed in culture medium and stored as a pool of follicles (29) in RNAlater Solution (Ambion) at -80°C until RNA extraction.

### **RNA extraction and cDNA synthesis**

Cell RNA was extracted following the biological tissue extraction protocol of the RNeasy kit (Qiagen, DE) according to the manufacturer's instructions and with RNase-Free DNase Set (Qiagen, DE). RNA concentration and integrity were verified in the Agilent 4200 TapeStation system (Agilent Technologies, US). Messenger RNA (mRNA) was converted to complementary DNA (cDNA) with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, US) according to the manufacturer's instructions for a 20- $\mu$ L reaction mix in the presence of ribonuclease inhibitor-RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, US).

### **Analysis of gene expression**

Gene expression was determined by real-time PCR with Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems, US) according to the manufacturer's instructions. Expression levels of the genes of interest were normalized against the expression of the endogenous control glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH* - Catalog number: 4310884E - Applied Biosystems, US). Real-time PCR was performed on the QuantStudio 3 System (Applied Biosystems, US) under the following conditions: 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C, 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C W. Limit cycle (Ct) values over 38 cycles were considered indicators of undetermined gene expression and omitted from the analysis. The relative

quantification of gene expression was determined using the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (30) model and through the Relative Quantification application available in Thermo Fisher Cloud (Thermo Fisher Scientific).

### **Ethical aspects**

This study was approved by the Ethics Committee of HCPA under project No. 14-0386.

### **Sample size**

Since there are no data in the literature on SMAD4 and endometriosis, and considering that SMAD4 is the molecule with the greatest influence in the physiological context because it acts as Co-SMAD for all members of the TGF- $\beta$  superfamily, the expression of *SMAD4* was considered as an outcome primary. Twelve patients are required to have a 80% chance of detecting, as significant at the 5% level, a decrease in the primary outcome measure from 100% in the control group to 40% in the experimental group (31).

### **Statistical analysis**

Student's t-test was used to compare continuous variables, and the  $\chi^2$  test was used to compare categorical variables. The statistical package used was IBM SPSS Statistics version 18.0; the results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation, and  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

Relative Quantification analysis available on the Thermo Fisher cloud (Thermo Fisher Scientific) provided relative quantification (RQ), minimum RQ, maximum RQ and *P*-corrected expression data.

The relative quantification of gene expression was also calculated by the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (30) method, where expression of the target gene is normalized with the endogenous control (*GAPDH*). We then compared gene expression between the study groups (control and endometriosis) and performed multivariate analysis (binary regression) with our data to evaluate the simultaneous action of the factors on the outcome (endometriosis) with a significance level of 5% in IBM SPSS Statistics version 18.0.

## Results

Age, days of controlled ovarian hyperstimulation, initial dose of gonadotrophin, number of oocytes at metaphase II and pregnancy in patients are shown in Table 1 and did not show statistical difference between the groups studied.

*AMH*, *GDF-9*, *INHA*, *INHBB*, *TGF $\beta$ 3*, *AMHR2*, *BMPR2*, *TGF $\beta$ R3* and *SMAD3* showed gene expression in granulosa cells of antral follicles, but without significant statistical difference between the groups. These data are shown in Table 2. The *BMP-6* gene showed a Relative Quantification of 0.507 (RQ=0.355-0.524) ( $P=0.013$ ) and *SMAD4* 0.624 (RQ=0.529-0.735) ( $P=0.044$ ) indicating decreased expression in infertile patients with endometriosis compared to the group of patients submitted to IVF due to tubal or male factor. The results of relative gene expression are shown in Figure 1.

In multivariate evaluation (binary regression), considering the presence or absence of endometriosis, only *SMAD4* was a significant ( $P=0.045$ ) factor associated with endometriosis, controlling for all other TGF- $\beta$  superfamily members studied.



## Discussion

Infertility is a frequent complaint among patients with endometriosis, and it is common to seek assisted reproductive techniques as an alternative to resolve the reproductive abnormalities of the spontaneous cycle. The exogenous hormonal induction of ovarian function performed in IVF reverses the natural physiological changes, correcting the reproductive outcome, which is why there were no reproductive differences between infertile women with endometriosis and women submitted to IVF due to tubal or male cause in our study.

The ligands *AMH*, *GDF-9*, *INHA*, *INHBB* and *TGF $\beta$ 3* showed no difference in expression between the groups studied, which allowed us to infer that they act satisfactorily and are not involved in infertility associated with endometriosis.

*BMP-6* is expressed in oocytes and granulosa cells and acts by increasing *AMH* and *FSH receptor* expression, decreasing *StAR* and *GDNF* expression, suppressing luteinization by decreasing progesterone production (6, 32, 33), thus making their participation in good oocyte quality unquestionable. We demonstrated that *BMP-6* had decreased relative expression in the group of infertile patients with endometriosis and might have been associated with reproductive abnormalities in these patients. This finding contributes to our understanding of the poor oocyte quality in endometriosis, being the first study to explore this protein in granulosa cells of antral follicles in this group of patients.

*GDF-9* is mainly expressed by the oocyte, but its mRNA appears in granulosa cells after the LH peak (34). Kawabe et al. (35) reported a negative effect of moderate to severe endometriosis on *GDF-9* expression in granulosa cells after hormonal induction, suggesting low oocyte nuclear maturation and poor embryo quality. Our findings revealed similar expression of *GDF-9* in granulosa cells in patients with and without peritoneal endometriosis. The difference in endometriosis classification between the two studies limits the comparison, but the findings contribute to the understanding that *GDF-9* expression is affected according to disease characteristics.

We also demonstrated that *TGF $\beta$ 3* is expressed in granulosa cells from human antral follicles after controlled ovarian hyperstimulation. This finding complements the idea of Kristensen et al., because in their study, *TGF $\beta$ 3* was absent in preantral follicles (14). On the basis of these results, we can assume that *TGF $\beta$ 3* is expressed in later stages of development or that it may appear only after the LH peak, since the cells in

our study were luteinized. In view of these questions, it would be interesting if further studies were undertaken to better understand the participation of this protein in oocyte development.

TGF- $\beta$  superfamily proteins perform their functions in the target cell through serine/threonine-kinase type I and II transmembrane receptors which propagate the signal through the phosphorylation of intracellular transducers of the SMAD family (R-SMAD - receptor-regulated SMADs) (12, 13). Our gene expression results demonstrated that the *AMHR2*, *BMPR2* and *TGF $\beta$ 3* receptors and *SMAD3* (R-SMAD) showed similar behavior in the Control and Endometriosis groups.

Intracellular signaling is also dependent on a common mediator (Co-SMAD - Co-mediator), *SMAD4*, which forms a complex with the R-SMADs phosphorylated by the receptors allowing their passage to the cell nucleus, where, associated with binding to DNA, this complex can regulate the expression of target genes (12, 13, 14). We have shown that *SMAD4* has decreased expression level in endometriosis. This is the most striking finding of our work, since this led us to believe that the functionality of all TGF- $\beta$  superfamily proteins dependent on this signaling pathway is compromised in this group of patients. The signaling pathway of the TGF- $\beta$  superfamily can be observed in Figure 2, with emphasis on the altered phases in endometriosis.

It is important to remember that our result demonstrated the abundance of mRNA available for translating these genes into protein, a very important process that, however, does not necessarily reflect protein translation (36). The adequate or compromised function of these proteins depends on the translation efficacy of this mRNA, in addition to mRNA availability, which can be verified by Western blot by detecting the presence of the proteins in the granulosa cell homogenate (37). Since we demonstrated that the availability of *BMP-6* and *SMAD4* mRNA is decreased in infertility associated with endometriosis, the analysis of the presence of the proteins becomes a prospect of our study.

Our study had limitations with respect to the heterogeneity of the disease and we selected only patients with peritoneal endometriosis to minimize this interference, but this limitation is common to all studies involving endometriosis.

Unsurprisingly, infertile women with endometriosis have compromised granulosa cell functions (24, 25, 26, 27), and our study showed that members of the TGF- $\beta$  superfamily contribute to changes in folliculogenesis, resulting in a decreased

*BMP-6* and *SMAD4* mRNA expression in granulosa cells of patients with peritoneal endometriosis.

Furthermore, we plan to investigate the presence of proteins that demonstrated altered gene expression, using Western blot, and accordingly, to study *in vitro* maturation with specific supplementation of the culture medium that provides an adequate environment for the development of oocytes. In this way we could help these patients by obtaining more competent oocytes and by avoiding ovarian stimulation with supraphysiological doses of gonadotropins used in conventional IVF.

## **Acknowledgements**

We thank Lisiane Knob for the assistance provided in the sample collection, Hugo Bock for the technical-scientific support and Thiago Augusto Cosme da Silva for the design support. We thank the financial support of the Research Incentive Fund (Fundação de Incentivo a Pesquisas e Eventos - FIPE) - Clinical Hospital of Porto Alegre (Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA), National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES).

## References

- 1 – Kidder GM, Vanderhyden BC. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010;88(4):399-413.
- 2 – Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril.* 2015;103(2):303-16.
- 3 – Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod.* 1986 Feb;1(2):81-7.
- 4 – Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.* 2006;132(2):191-206.
- 5 – Homburg R, Crawford G. The role of AMH in anovulation associated with PCOS: a hypothesis. *Hum Reprod.* 2014;29(6):1117-21.
- 6 – Kim JW, Kang KM, Yoon TK, Shim SH, Lee WS. Study of circulating hepcidin in association with iron excess, metabolic syndrome, and BMP-6 expression in granulosa cells in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2014;102(2):548-554.e2.
- 7 – Da Broi MG, Giorgi VSI, Wang F, Keefe DL, Albertini D, Navarro PA. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(5):735-751.
- 8 – Trombly DJ, Woodruff TK, Mayo KE. Roles for transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis. *Semin Reprod Med.* 2009;27:14–23.
- 9 – Walton KL, Mankanji Y, Robertson DM, Harrison CA. The synthesis and secretion of inhibins. *Vitam Horm.* 2011;85:149-84.
- 10 – Pangas SA. Regulation of the ovarian reserve by members of the transforming growth factor beta family. *Mol Reprod Dev.* 2012;79(10):666-79.
- 11 – Liang N, Xu Y, Yin Y, Yao G, Tian H, Wang G, Lian J, Wang Y, Sun F. Steroidogenic factor-1 is required for TGF-beta3-mediated 17beta-estradiol synthesis in mouse ovarian granulosa cells. *Endocrinology.* 2011;152(8):3213-25.
- 12 – Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113(6):685-700.

- 13 – Wrana JL. Signaling by the TGF $\beta$  superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(10):a011197.
- 14 – Kristensen SG, Andersen K, Clement CA, Franks S, Hardy K, Andersen CY. Expression of TGF-beta superfamily growth factors, their receptors, the associated SMADs and antagonists in five isolated size-matched populations of pre-antral follicles from normal human ovaries. *Mol Hum Reprod.* 2014;20(4):293-308.
- 15 – Dela Cruz C, Reis FM. The role of TGF $\beta$  superfamily members in the pathophysiology of endometriosis. *Gynecol Endocrinol.* 2015 Jul;31(7):511-5.
- 16 – Mabuchi Y, Yamoto M, Minami S, Umesaki N. Immunohistochemical localization of inhibin and activin subunits, activin receptors and Smads in ovarian endometriosis. *Int J Mol Med.* 2010 Jan;25(1):17-23.
- 17 – Zheng J, Qu J, Lu P, Hou Z, Cui Y, Mao Y, Qi X, Ji H, Liu J. Activin A Stimulates Aromatase via the ALK4-Smad Pathway in Endometriosis. *Biomed Res Int.* 2016;2016:5791510. Epub 2016 Oct 19.
- 18 – Carrarelli P, Rocha AL, Belmonte G, Zupi E, Abrão MS4, Arcuri F, Piomboni P, Petraglia F. Increased expression of antimüllerian hormone and its receptor in endometriosis. *Fertil Steril.* 2014 May;101(5):1353-8.
- 19 – Ping S, Ma C, Liu P, Yang L, Yang X, Wu Q, Zhao X, Gong B. Molecular mechanisms underlying endometriosis pathogenesis revealed by bioinformatics analysis of microarray data. *Arch Gynecol Obstet.* 2016 Apr;293(4):797-804.
- 20 – Correa LF, Zheng Y, Delaney AA, Khan Z, Shenoy CC, Daftary GS. TGF- $\beta$  Induces Endometriotic Progression via a Noncanonical, KLF11-Mediated Mechanism. *Endocrinology.* 2016 Sep;157(9):3332-43.
- 21 – Shi LB, Zhou F, Zhu HY, Huang D, Jin XY, Li C, Dai Y, Pan YB, Zhang SY. Transforming growth factor beta1 from endometriomas promotes fibrosis in surrounding ovarian tissues via Smad2/3 signaling. *Biol Reprod.* 2017 Jan 1;97(6):873-882.
- 22 – Lin X, Dai Y, Xu W, Shi L, Jin X, Li C, Zhou F, Pan Y, Zhang Y, Lin X, Zhang S. Hypoxia Promotes Ectopic Adhesion Ability of Endometrial Stromal Cells via TGF- $\beta$ 1/Smad Signaling in Endometriosis. *Endocrinology.* 2018 Apr 1;159(4):1630-1641.

- 23 – Athanasios F, Afrodite N, Effstratios P, Demetrios K. Co-expression of bone morphogenetic protein 6 with estrogen receptor  $\alpha$  in endometriosis. *Arch Gynecol Obstet.* 2012 Apr;285(4):1001-7.
- 24 – Cunha-Filho JS, Gross JL, Lemos NA, Brandelli A, Castillos M, Passos EP. Hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients with mild and minimal endometriosis. *Horm Metab Res.* 2001;33(4):216-20.
- 25 – Cunha-Filho JS, Gross JL, Bastos de Souza CA, Lemos NA, Giugliani C, Freitas F, Passos EP. Physiopathological aspects of corpus luteum defect in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *J Assist Reprod Genet.* 2003;20(3):117-21.
- 26 – Harlow CR, Cahill DJ, Maile LA, Talbot WM, Mears J, Wardle PG, Hull MG. Reduced preovulatory granulosa cell steroidogenesis in women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(1):426-9.
- 27 – Sanchez AM, Somigliana E, Vercellini P, Pagliardini L, Candiani M, Vignani P. Endometriosis as a detrimental condition for granulosa cell steroidogenesis and development: From molecular alterations to clinical impact. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;155(Pt A):35-46.
- 28 – De Conto E, Matte Ú, Bilibio JP, Genro VK, Souza CA, Leão DP, Cunha-Filho JS. Endometriosis-associated infertility: GDF-9, AMH, and AMHR2 genes polymorphisms. *J Assist Reprod Genet.* 2017;34(12):1667-1672.
- 29 – Assou S, Haouzi D, Dechaud H, Gala A, Ferrières A, Hamamah S. Comparative gene expression profiling in human cumulus cells according to ovarian gonadotropin treatments. *Biomed Res Int.* 2013;2013:354582.
- 30 – Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- 31 – Schauer SN, Sontakke SD, Watson ED, Esteves CL, Donadeu FX. Involvement of miRNAs in equine follicle development. *Reproduction.* 2013 Jul 31;146(3):273-82.
- 32 – Liang Y, Cao Q, Gao X, Du H. Increased bone morphogenetic protein-6 in follicular fluid and granulosa cells may correlate with fertilization and embryo quality in humans. *Exp Ther Med.* 2017;14(2):1171-1176.

- 33 – Zhang XY, Chang HM, Taylor EL, Leung PCK, Liu RZ. BMP6 down-regulates GDNF expression through SMAD1/5 and ERK1/2 signaling pathways in human granulosa-lutein cells. *Endocrinology*. 2018 May 9. doi: 10.1210/en.2018-00189. [Epub ahead of print]
- 34 – Yamamoto N, Christenson LK, McAllister JM, Strauss JF. Growth differentiation factor-9 inhibits 3'5'-adenosine monophosphate-stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jun;87(6):2849-56.
- 35 – Kawabe S, Yamashita Y, Saito N, Kokunai K, Hayashi A, Hayashi M, Terai Y, Miyazaki K, Ohmichi M. The effect of moderate to severe endometriosis on expression of growth differentiation factor-9 mRNA in human granulosa cells under controlled ovarian hyperstimulation. *Reprod Med Biol*. 2015 May 19;14(4):179-184.
- 36 – Radhakrishnan A, Green R. Connections Underlying Translation and mRNA Stability. *J Mol Biol*. 2016 Sep 11;428(18):3558-64.
- 37 – Yung Y, Aviel-Ronen S, Maman E, Rubinstein N, Avivi C, Orvieto R, Hourvitz A. Localization of luteinizing hormone receptor protein in the human ovary. *Mol Hum Reprod*. 2014 Sep;20(9):844-9.



## Attachments

**Table 1**

**Table 1** - Demographic and assisted reproduction data of the studied groups.

|   | Control (n=18) | Endometriosis (n=10) | P-value |
|---|----------------|----------------------|---------|
| Age (years)                                 | 33.1±3.6       | 32.5±4.1             | 0.688   |
| Days of controlled ovarian hyperstimulation | 11.6±1.9       | 11.0±1.7             | 0.460   |
| Initial dose of gonadotrophin               | 205±66         | 246±57               | 0.170   |
| Number of MII oocytes                       | 9.7±3.7        | 11.1±2.6             | 0.345   |
| Positive hCG (%)                            | 55             | 40                   | 0.692   |

Student's t-test was used to compare continuous variables and  $\chi^2$  test was used to compare categorical variable.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

Values are mean  $\pm$  SD or %.

**Table 2**

**Table 2.** Results of gene expression of TGF- $\beta$  superfamily members comparing the Control and Endometriosis groups.

| Function                      | Gene                           | Group (n)                 | RQ           | RQ min       | RQ max       | <i>P</i> -value |
|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| Ligands                       | <i>AMH</i>                     | Control (16)              | 1            | 0.708        | 1.412        | 1.000           |
|                               |                                | Endometriosis (10)        | 1.151        | 0.868        | 1.527        |                 |
|                               | <b><i>BMP-6</i></b>            | <b>Control (18)</b>       | <b>1</b>     | <b>0.766</b> | <b>1.306</b> | <b>0.013</b>    |
|                               |                                | <b>Endometriosis (10)</b> | <b>0.431</b> | <b>0.355</b> | <b>0.524</b> |                 |
|                               | <i>GDF-9</i>                   | Control (14)              | 1            | 0.594        | 1.684        | 0.084           |
|                               |                                | Endometriosis (9)         | 0.440        | 0.269        | 0.718        |                 |
|                               | <i>INHA</i>                    | Control (18)              | 1            | 0.830        | 1.205        | 0.494           |
|                               |                                | Endometriosis (10)        | 0.677        | 0.492        | 0.932        |                 |
|                               | <i>INHBB</i>                   | Control (18)              | 1            | 0.720        | 1.388        | 0.096           |
|                               |                                | Endometriosis (10)        | 0.408        | 0.284        | 0.587        |                 |
| <i>TGF<math>\beta</math>3</i> | Control (17)                   | 1                         | 0.739        | 1.354        | 0.320        |                 |
|                               | Endometriosis (10)             | 0.603                     | 0.427        | 0.851        |              |                 |
| Receptors                     | <i>AMHR2</i>                   | Control (15)              | 1            | 0.711        | 1.405        | 0.990           |
|                               |                                | Endometriosis (10)        | 0.841        | 0.468        | 1.513        |                 |
|                               | <i>BMPR2</i>                   | Control (18)              | 1            | 0.848        | 1.179        | 0.802           |
|                               |                                | Endometriosis (10)        | 0.815        | 0.655        | 1.014        |                 |
|                               | <i>TGF<math>\beta</math>R3</i> | Control (18)              | 1            | 0.801        | 1.248        | 1.000           |
|                               |                                | Endometriosis (10)        | 0.831        | 0.575        | 1.201        |                 |
| Intracellular Signaling       | <i>SMAD3</i>                   | Control (18)              | 1            | 0.835        | 1.198        | 0.381           |
|                               |                                | Endometriosis (10)        | 0.761        | 0.654        | 0.887        |                 |
|                               | <b><i>SMAD4</i></b>            | <b>Control (18)</b>       | <b>1</b>     | <b>0.864</b> | <b>1.157</b> | <b>0.044</b>    |
|                               |                                | <b>Endometriosis (10)</b> | <b>0.624</b> | <b>0.529</b> | <b>0.735</b> |                 |

Results expressed in Relative Quantification (RQ) verified by the  $\Delta\Delta C_t$  method in the Relative Quantification App (Thermo Fisher Scientific). *P* <0.05 was considered statistically significant.

Figure 1

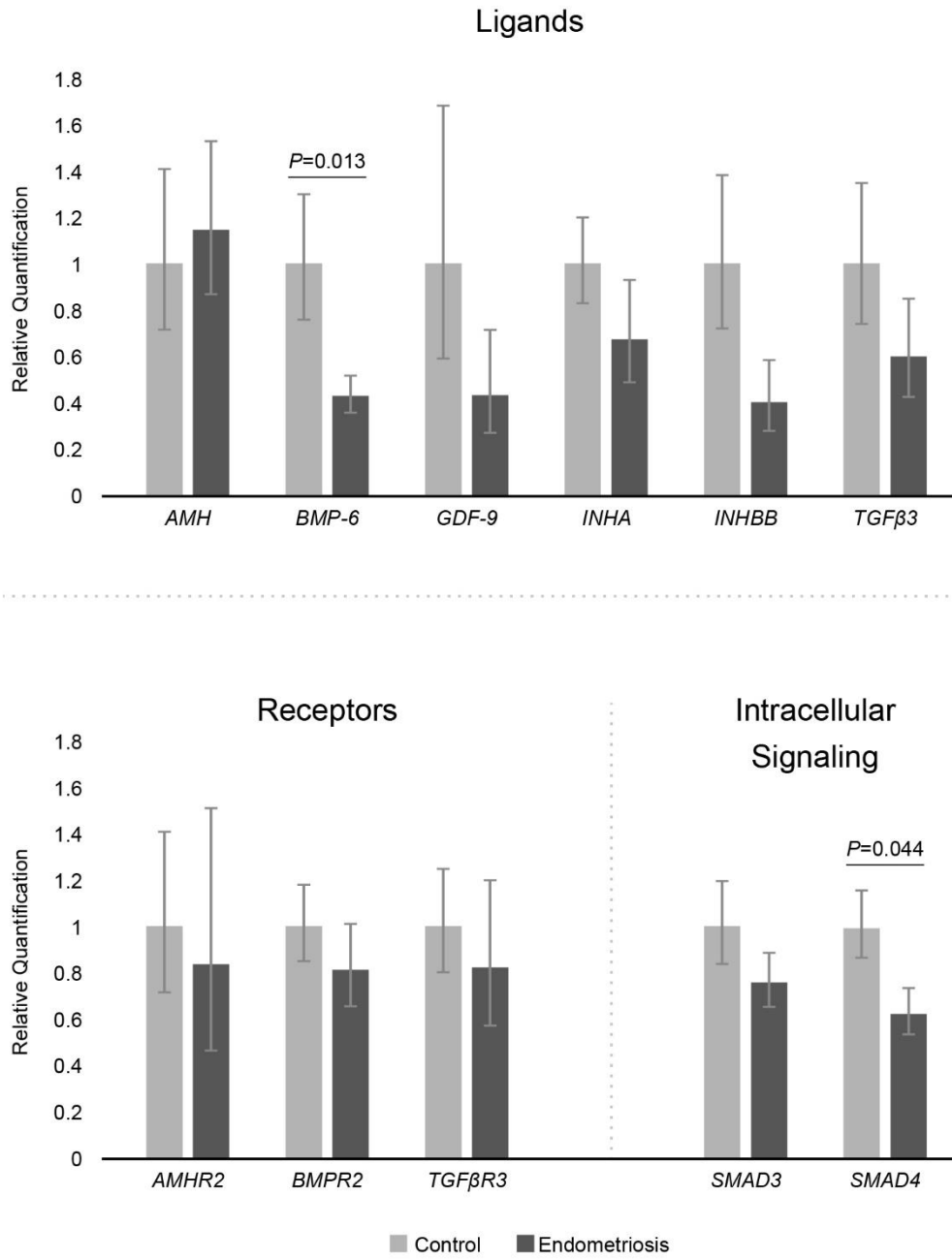
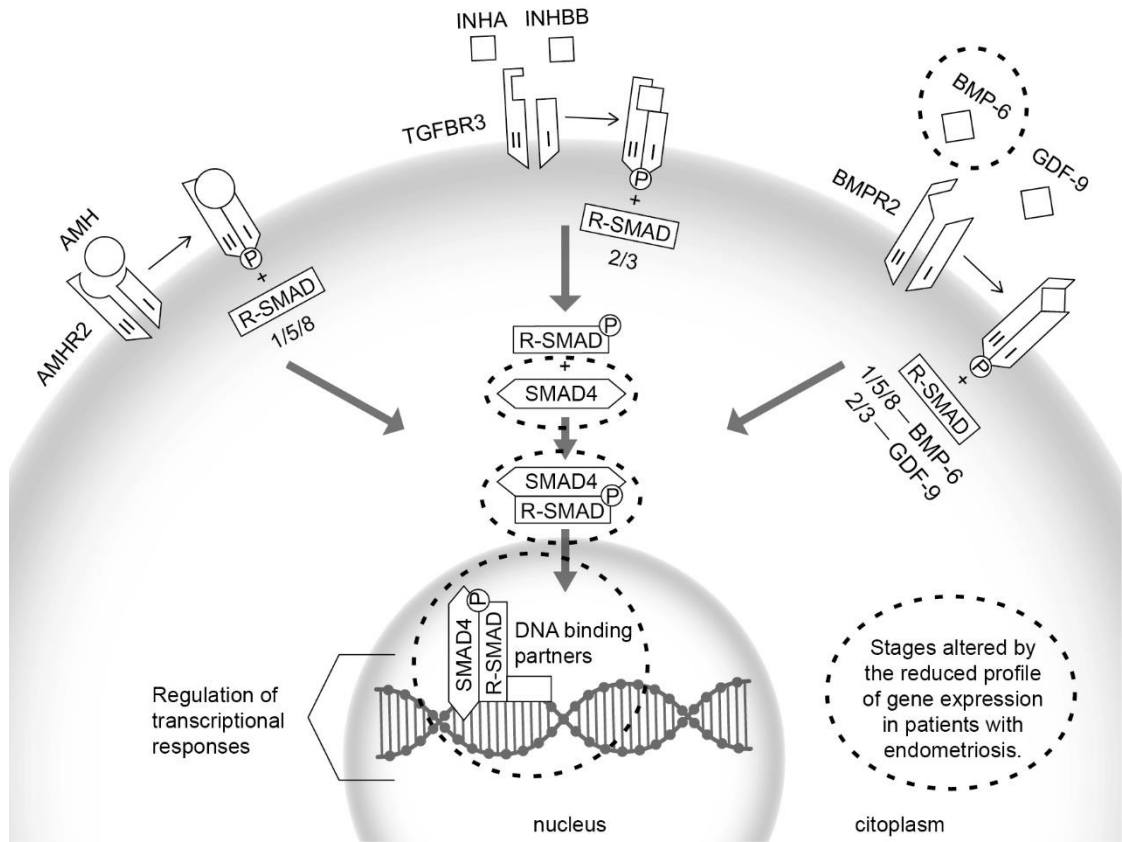


Figure 2



## Legends for Figures

**Figure 1.** Relative quantification of gene expression of TGF- $\beta$  superfamily members, comparing the control group (women undergoing IVF due to tubal or male factor) and the endometriosis group (infertile women with endometriosis undergoing IVF). Other quantifications showed  $P>0.05$ .

**Figure 2.** Demonstration of intracellular signaling of TGF- $\beta$  superfamily members through their transmembrane receptors via SMAD to regulate transcriptional responses of target genes in the cell nucleus. The altered steps in infertile patients with endometriosis are highlighted.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS (Conclusões)

A linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida por nosso grupo tem como objetivo principal elucidar questionamentos sobre a infertilidade associada à endometriose. Já foi demonstrado que existem anormalidades funcionais nas células da granulosa das pacientes acometidas por essa doença e, mais recentemente, demonstramos que o *hormônio anti-Mulleriano* apresenta maior frequência do alelo polimórfico do que o alelo selvagem para a mutação p.Ile49Ser em mulheres inférteis com endometriose. Sabendo do envolvimento de membros da superfamília TGF- $\beta$  com a qualidade oocitária e que há alteração genética na endometriose, nos sentimos incentivados a determinar a expressão gênica dos membros de destaque desta família de proteínas nesta doença ginecológica.

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez que membros da superfamília TGF- $\beta$  apresentam expressão gênica alterada em células da granulosa de folículos antrais de mulheres inférteis com endometriose. A diminuição da expressão de *BMP-6* afeta a qualidade e a quantidade de oócitos dessas pacientes, porque essa proteína tem papel importante tanto no desenvolvimento dos folículos antrais como na preservação da reserva ovariana através da regulação de expressão do AMH.

A expressão diminuída de *SMAD4* na endometriose associada à infertilidade afeta sobremaneira a qualidade oocitária, pois essa molécula é o Co-SMAD, imprescindível para a atividade de inúmeros ligantes da superfamília TGF- $\beta$  por encaminhar ao núcleo, em complexo com os R-SMADs, a informação emitida pelos ligantes. Sem a quantidade suficiente de *SMAD4* no citoplasma da célula, a função dos ligantes fica comprometida e essa é uma explicação do porquê as mulheres inférteis com endometriose têm qualidade oocitária menor e mais dificuldade para gestar naturalmente do que mulheres sem endometriose.

## 9 PERSPECTIVAS

Nosso trabalho trouxe um dado importante para o entendimento da patogênese da endometriose associada à infertilidade e nos instiga a analisar a presença das proteínas alteradas através de técnicas imunológicas nas células da granulosa desse grupo de pacientes.

A partir dos achados do presente estudo, podemos elaborar alternativas que beneficiem esse grupo de pacientes, como a maturação *in vitro* dos oócitos com meio de cultivo suplementado com as proteínas BMP-6 e SMAD4 humanas recombinantes para corrigir a baixa expressão endógena ocasionada pela endometriose. Dessa forma, seria diminuído o custo do tratamento hormonal e o tempo do ciclo de reprodução assistida, porém, o mais importante: obteríamos oócitos de melhor qualidade sem expor a paciente a doses supra-fisiológicas de gonadotrofinas exógenas como se faz no ciclo tradicional de FIV.

## 10 ANEXOS

### Anexo 1

#### Metodologia

##### Desenho do estudo

Foi realizado um estudo de caso-controle para avaliar a expressão gênica de membros da superfamília TGF- $\beta$  (ligantes – *AMH*, *BMP-6*, *GDF-9*, *INHA*, *INHBB* e *TGF $\beta$ 3*; receptores – *AMHR2*, *BMPR2* e *TGF $\beta$ R3*; sinalizadores intracelulares – *SMAD3* e *SMAD4*) em células da granulosa de folículos ovarianos antrais de mulheres inférteis com endometriose comparando-as com mulheres submetidas à fertilização *in vitro* (FIV) por infertilidade tubária ou masculina. O recrutamento de pacientes e a coleta de células da granulosa foi realizada no Centro de Reprodução Humana Insemine e o experimento de expressão gênica foi realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), ambos localizados em Porto Alegre/Brasil. Este estudo está de acordo com STROBE guidelines para estudos de caso-controle.

##### Pacientes

Os critérios de elegibilidade de pacientes para os dois grupos foram: mulheres com idade entre 25 e 38 anos, ciclos menstruais regulares, ultrassom para rastreio de endometriose negativo e presença de ambos os ovários submetidas à FIV.

Critérios de inclusão para o grupo controle: mulheres submetidas à FIV por fator tubário ou fator masculino como causa de infertilidade do casal, estas mulheres não poderiam ter cólicas, uso prévio de medicação para dor, dismenorreia, nem histórico familiar de endometriose.

Critérios de inclusão para o grupo de estudo: mulheres inférteis submetidas à FIV com endometriose peritoneal como única causa de infertilidade do casal. A inclusão de somente endometriose peritoneal tem a intenção de aumentar a homogeneidade do grupo.

Com base nesses critérios, vinte e oito mulheres submetidas à FIV no Centro de Reprodução Humana Insemine foram recrutadas para este estudo, sendo que dezoito fizeram parte do grupo Controle e dez formaram o grupo Endometriose.



### **Hiperestimulação ovariana controlada**

A hiperestimulação ovariana controlada foi realizada com FSH recombinante humano (Puregon, Vetter Pharma-Fertigung GmbH & Co. KG, Alemanha) e supressão da hipófise com antagonista de GnRH (Orgalutran, Vetter Pharma-Fertigung GmbH & Co. KG, Alemanha) em um protocolo fixo de seis dias. A dose diária de FSH foi ajustada a partir do sexto dia de acordo com o número de folículos em crescimento visualizados através de ultrassonografia. Nos últimos dias de hiperestimulação ovariana controlada, a ultrassonografia foi realizada diariamente e a ovulação foi induzida até que pelo menos três folículos apresentassem diâmetro de 17mm, nesse momento foi administrado gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Choriomon-M, IBSA Institut Biochimique S.A., Suíça) para promover a maturação folicular final e a aspiração dos folículos foi realizada 36 horas depois por orientação ultrassonográfica.

### **Coleta de células da granulosa**

Os folículos antrais foram puncionados como protocolo padrão de FIV e as células da granulosa foram coletadas de pacientes que tiveram no mínimo quatro oócitos recuperados. A coleta das células foi realizada mecanicamente com auxílio de agulhas 22G, em seguida as células coletadas foram lavadas em meio de cultura e armazenadas como pool de folículos (1) em RNAlater Solution (Ambion), identificadas anonimamente de acordo o grupo ao qual pertenciam, permanecendo em temperatura de -80°C até a extração de RNA.

### **Obtenção de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)**

O RNA das células foi extraído seguindo o protocolo de extração para tecido biológico do kit RNeasy (Qiagen, DE) conforme instruções do fabricante e com enzima DNase – RNase-Free DNase Set (Qiagen, DE). Concentração e integridade do RNA foram verificados em Agilent 4200 TapeStation system (Agilent Technologies, US). A concentração variou entre 14,7 e 95,0 ng/μL e a integridade obtida foi RINe (escore de qualidade do TapeStation) 6,6 a 10,0 sendo que a maioria das amostras apresentou RINe ou igual ou superior a 9,0. Dados do TapeStation para algumas amostras são mostrados a título de exemplo na Figura 1. As amostras de RNA foram armazenadas a -80°C até a realização da síntese cDNA.

A síntese de cDNA foi realizada com kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, US) a partir de uma concentração padronizada de

19,4ng de RNA, conforme instruções do fabricante para uma reação de 20µL em presença de inibidor de ribonuclease – RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, US).

### **Análise de expressão gênica**

A expressão gênica foi verificada através de ensaios Taqman Gene Expression (Applied Biosystems, US) conforme instruções do fabricante e todas as amostras foram analisadas em uma única placa para cada gene de interesse a fim de minimizar as variações entre placas. Os níveis de expressão dos genes de interesse foram normalizados contra a expressão do controle endógeno gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH* – Catalog number: 4310884E – Applied Biosystems, US).

As reações de amplificação foram realizadas em triplicata e os ensaios utilizados estão descritos na Tabela 1 (2). As reações foram realizadas em volume total de 20µL utilizando o reagente TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, US), TaqMan Gene Expression Assay FAM (Applied Biosystems, US) para os genes de interesse em reação duplex com o TaqMan Gene Expression Assay VIC (Applied Biosystems, US) para o *GAPDH* e 1µL de cDNA foi utilizado como template. A PCR em tempo real foi realizada no equipamento QuantStudio 3 System (Applied Biosystems, US) nas seguintes condições: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

Valores do ciclo limite (Ct) acima de 38 ciclos foram considerados indicadores de expressão gênica indeterminada e omitidos da análise. A quantificação relativa da expressão gênica foi verificada através do modelo  $\Delta\Delta Ct$  (3) (resultados em anexo) e usando o aplicativo Relative Quantification disponível no Thermo Fisher Cloud (Tabela 2) (Thermo Fisher Scientific). O resultado gráfico da expressão gênica relativa é demonstrado na Figura 2.

### **Tamanho amostral**

Como não há dados na literatura sobre SMAD4 e endometriose, e considerando que SMAD4 é a molécula com maior influência no contexto fisiológico porque atua como Co-SMAD para todos os membros da superfamília TGF- $\beta$ , a expressão de SMAD4 foi considerada como desfecho primário. Doze pacientes são requeridos para se ter 80% de chance de detecção, com nível de significância de 5%, para uma diminuição no desfecho primário de 100% no grupo controle para 40% no grupo experimental (4).

### **Aspectos éticos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética do HCPA sob projeto número 14-0386.

### **Análise estatística**

Teste t de Student foi usado para comparar variáveis contínuas e teste  $\chi^2$  foi usado para comparar variáveis categóricas. O pacote estatístico utilizado foi o IBM SPSS Statistics versão 18.0, os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio-padrão e o valor de  $P < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

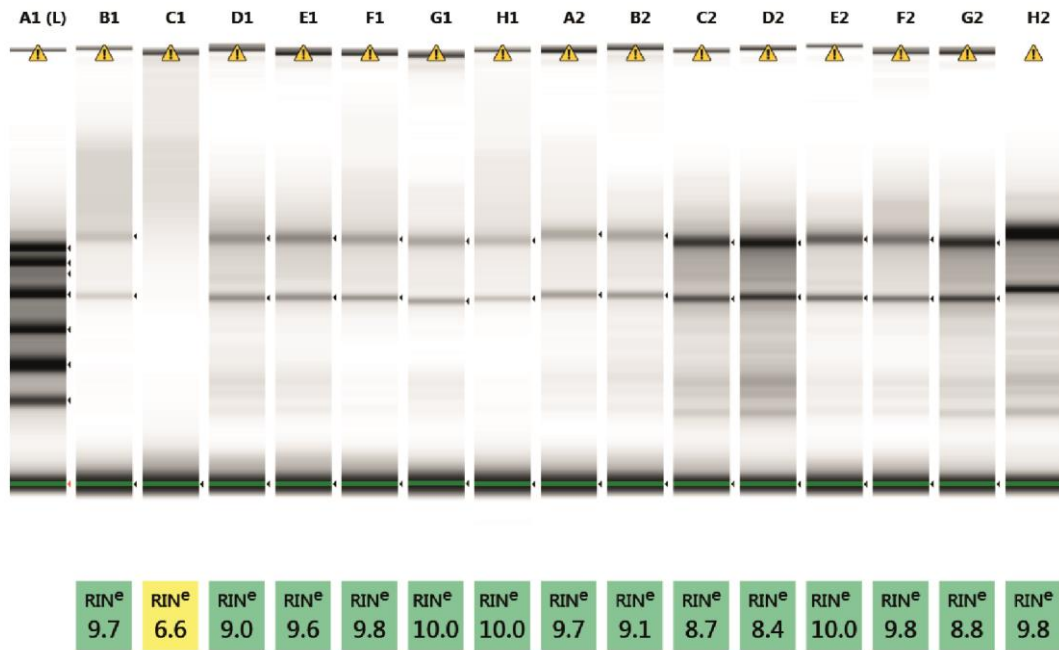
A análise no aplicativo Relative Quantification disponível no Thermo Fisher Cloud (Thermo Fisher Scientific) forneceu dados de expressão como Quantificação Relativa (RQ), RQ mínima, RQ máxima e valores P corrigidos.

A Quantificação Relativa da expressão gênica foi calculada através do método  $\Delta\Delta C_t$  (3) que controla a expressão do gene alvo com o controle endógeno (*GAPDH*) e, em seguida, faz a relação de expressão entre os grupos de estudo (controle e endometriose) e foi realizada análise multivariada (regressão binária) com nossos dados para avaliar a ação simultânea dos fatores no desfecho (endometriose) com nível de significância de 5% em IBM SPSS Statistics versão 18.0.

### **Referências da metodologia**

- 1 - Assou S, Haouzi D, Dechaud H, Gala A, Ferrières A, Hamamah S. Comparative gene expression profiling in human cumulus cells according to ovarian gonadotropin treatments. *Biomed Res Int.* 2013;2013:354582.
- 2 - Website Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/taqman-gene-expression/single-tube-taqman-gene-expression-analysis.html>. Acesso em 4 de junho de 2017.
- 3 - Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$  Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- 4 - Schauer SN, Sontakke SD, Watson ED, Esteves CL, Donadeu FX. Involvement of miRNAs in equine follicle development. *Reproduction.* 2013 Jul 31;146(3):273-82.

## Anexo 2



**Figura 1.** Integridade de mRNA checada no sistema Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies). Posição A1: Marcador de massa molecular de RNA. Posições B1 a H2: amostras de mRNA.

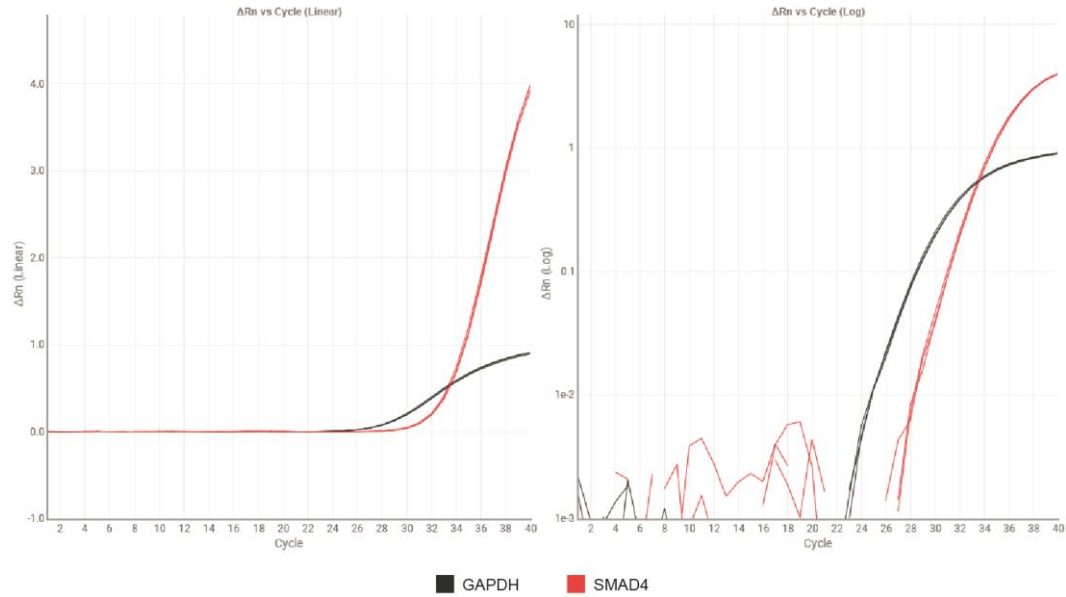
### Anexo 3

**Tabela 1.** Ensaios de expressão gênica TaqMan dos genes de interesse em detalhes.

| Função                       | Símbolo do gene | ID do gene | Nome do gene                               | ID do ensaio  |
|------------------------------|-----------------|------------|--|---------------|
| Ligantes                     | <i>AMH</i>      | 268        | anti-Mullerian hormone                     | Hs00174915_m1 |
|                              | <i>BMP-6</i>    | 654        | bone morphogenetic protein 6               | Hs01099594_m1 |
|                              | <i>GDF-9</i>    | 2661       | growth differentiation factor 9            | Hs03986126_s1 |
|                              | <i>INH A</i>    | 3623       | inhibin alpha subunit                      | Hs00171410_m1 |
|                              | <i>INH B B</i>  | 3625       | inhibin beta B subunit                     | Hs00173582_m1 |
|                              | <i>TGFβ3</i>    | 7043       | transforming growth factor beta 3          | Hs01086000_m1 |
| Receptores                   | <i>AMHR2</i>    | 269        | anti-Mullerian hormone receptor type 2     | Hs01086646_g1 |
|                              | <i>BMPR2</i>    | 659        | bone morphogenetic protein receptor type 2 | Hs00176148_m1 |
|                              | <i>TGFβR3</i>   | 7049       | transforming growth factor beta receptor 3 | Hs00234257_m1 |
| Sinalizadores intracelulares | <i>SMAD3</i>    | 4088       | SMAD family member 3                       | Hs00969210_m1 |
|                              | <i>SMAD4</i>    | 4089       | SMAD family member 4                       | Hs00929647_m1 |

Informações obtidas no Website Thermo Fisher Scientific (2).

## Anexo 4



**Figura 2.** Amplificação linear (a) e logarítmica (b) dos genes *GAPDH* (controle endógeno) e *SMAD4* (gene alvo) em triplicata.

## Anexo 5

**Tabela 2.** Resultados de expressão gênica de membros da superfamília TGF- $\beta$  comparando os grupos Controle e Endometriose.

| Função                       | Gene                           | Grupo (n)                | RQ           | RQ mín       | RQ máx       | Valor P      |
|------------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Ligantes                     | <i>AMH</i>                     | Controle (16)            | 1            | 0,708        | 1,412        | 1,000        |
|                              |                                | Endometriose (10)        | 1,151        | 0,868        | 1,527        |              |
|                              | <b><i>BMP-6</i></b>            | <b>Controle (18)</b>     | <b>1</b>     | <b>0,766</b> | <b>1,306</b> | <b>0,013</b> |
|                              |                                | <b>Endometriose (10)</b> | <b>0,431</b> | <b>0,355</b> | <b>0,524</b> |              |
|                              | <i>GDF-9</i>                   | Controle (14)            | 1            | 0,594        | 1,684        | 0,084        |
|                              |                                | Endometriose (9)         | 0,440        | 0,269        | 0,718        |              |
|                              | <i>INHA</i>                    | Controle (18)            | 1            | 0,830        | 1,205        | 0,494        |
|                              |                                | Endometriose (10)        | 0,677        | 0,492        | 0,932        |              |
|                              | <i>INHBB</i>                   | Controle (18)            | 1            | 0,720        | 1,388        | 0,096        |
|                              |                                | Endometriose (10)        | 0,408        | 0,284        | 0,587        |              |
|                              | <i>TGF<math>\beta</math>3</i>  | Controle (17)            | 1            | 0,739        | 1,354        | 0,320        |
|                              |                                | Endometriose (10)        | 0,603        | 0,427        | 0,851        |              |
| Receptores                   | <i>AMHR2</i>                   | Controle (15)            | 1            | 0,711        | 1,405        | 0,990        |
|                              |                                | Endometriose (10)        | 0,841        | 0,468        | 1,513        |              |
|                              | <i>BMPR2</i>                   | Controle (18)            | 1            | 0,848        | 1,179        | 0,802        |
|                              |                                | Endometriose (10)        | 0,815        | 0,655        | 1,014        |              |
|                              | <i>TGF<math>\beta</math>R3</i> | Controle (18)            | 1            | 0,801        | 1,248        | 1,000        |
|                              |                                | Endometriose (10)        | 0,831        | 0,575        | 1,201        |              |
| Sinalizadores intracelulares | <i>SMAD3</i>                   | Controle (18)            | 1            | 0,835        | 1,198        | 0,381        |
|                              |                                | Endometriose (10)        | 0,761        | 0,654        | 0,887        |              |
|                              | <b><i>SMAD4</i></b>            | <b>Controle (18)</b>     | <b>1</b>     | <b>0,864</b> | <b>1,157</b> | <b>0,044</b> |
|                              |                                | <b>Endometriose (10)</b> | <b>0,624</b> | <b>0,529</b> | <b>0,735</b> |              |

Resultados expressos em Quantificação Relativa (RQ - Relative Quantification) verificada pelo método  $\Delta\Delta C_t$  no Relative Quantification App (Thermo Fisher Scientific).  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## Anexo 6

### Gene alvo: *AMH*

Dados de expressão gênica de *AMH* e *GAPDH* para os grupos em estudo.

| Grupo | n  | <i>AMH</i>    |               |               |               | <i>GAPDH</i> |         |         |          |
|-------|----|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------|---------|----------|
|       |    | Ct1           | Ct2           | Ct3           | Ct médio      | Ct1          | Ct2     | Ct3     | Ct médio |
| 1     | 1  | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Omitido      | Omitido | Omitido | Omitido  |
| 1     | 2  | 37,701        | 36,550        | 35,432        | 36,561        | 26,975       | 27,189  | 27,166  | 27,110   |
| 1     | 3  | 34,713        | 34,521        | 34,727        | 34,654        | 26,917       | 26,928  | 27,024  | 26,956   |
| 1     | 4  | 36,800        | Indeterminado | Indeterminado | 36,800        | 29,993       | Omitido | Omitido | 29,993   |
| 1     | 5  | 34,800        | 35,506        | 34,867        | 35,057        | 28,121       | 28,112  | 28,153  | 28,129   |
| 1     | 6  | 35,708        | 37,274        | Indeterminado | 36,491        | 27,382       | 27,490  | Omitido | 27,436   |
| 1     | 7  | 35,726        | 34,193        | 35,214        | 35,044        | 25,110       | 25,337  | 25,377  | 25,274   |
| 1     | 8  | 36,705        | 36,909        | 36,882        | 36,832        | 29,565       | 29,662  | 29,660  | 29,629   |
| 1     | 9  | 35,132        | 34,746        | 36,144        | 35,340        | 30,263       | 30,643  | 30,534  | 30,480   |
| 1     | 10 | 37,207        | Indeterminado | Indeterminado | 37,207        | 28,622       | Omitido | Omitido | 28,622   |
| 1     | 11 | 36,499        | Indeterminado | Indeterminado | 36,499        | 28,665       | Omitido | Omitido | 28,665   |
| 1     | 12 | 35,137        | 35,675        | Indeterminado | 35,406        | 25,994       | 26,539  | Omitido | 26,267   |
| 1     | 13 | 33,956        | 36,486        | 35,217        | 35,220        | 27,647       | 27,988  | 27,935  | 27,857   |
| 1     | 14 | 36,740        | Indeterminado | Indeterminado | 36,740        | 28,653       | Omitido | Omitido | 28,653   |
| 1     | 15 | 35,077        | 34,475        | 35,496        | 35,016        | 24,900       | 24,974  | 24,883  | 24,919   |
| 1     | 16 | 31,767        | 33,118        | 32,448        | 32,444        | 24,855       | 25,135  | 24,960  | 24,983   |
| 1     | 17 | 34,360        | 34,241        | 34,475        | 34,359        | 25,560       | 25,632  | 25,615  | 25,602   |
| 1     | 18 | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Omitido      | Omitido | Omitido | Omitido  |
| 2     | 1  | 33,471        | 33,522        | 34,892        | 33,962        | 24,444       | 25,493  | 25,443  | 25,127   |
| 2     | 2  | 34,072        | 33,506        | 33,444        | 33,674        | 24,990       | 25,134  | 24,921  | 25,015   |
| 2     | 3  | 30,974        | 31,244        | 30,945        | 31,054        | 24,692       | 24,843  | 24,554  | 24,696   |
| 2     | 4  | 36,314        | 35,813        | 36,564        | 36,231        | 29,393       | 29,534  | 29,230  | 29,386   |
| 2     | 5  | 33,308        | 33,577        | 33,467        | 33,451        | 25,388       | 25,700  | 25,487  | 25,525   |
| 2     | 6  | 35,798        | 33,836        | 34,820        | 34,818        | 27,770       | 27,780  | 28,030  | 27,860   |
| 2     | 7  | 32,394        | 32,874        | 32,479        | 32,582        | 24,192       | 24,392  | 24,178  | 24,254   |
| 2     | 8  | 33,509        | 32,727        | 33,773        | 33,336        | 24,292       | 24,417  | 24,603  | 24,437   |
| 2     | 9  | 35,448        | Indeterminado | Indeterminado | 35,448        | 27,616       | Omitido | Omitido | 27,616   |
| 2     | 10 | 36,456        | Indeterminado | Indeterminado | 36,456        | 28,062       | Omitido | Omitido | 28,062   |

Grupo 1 = Controle, Grupo 2 = Endometriose



**Gene alvo: *AMH* (continuação)**Cálculos de expressão gênica relativa para *AMH* - método  $\Delta\Delta Ct$ .

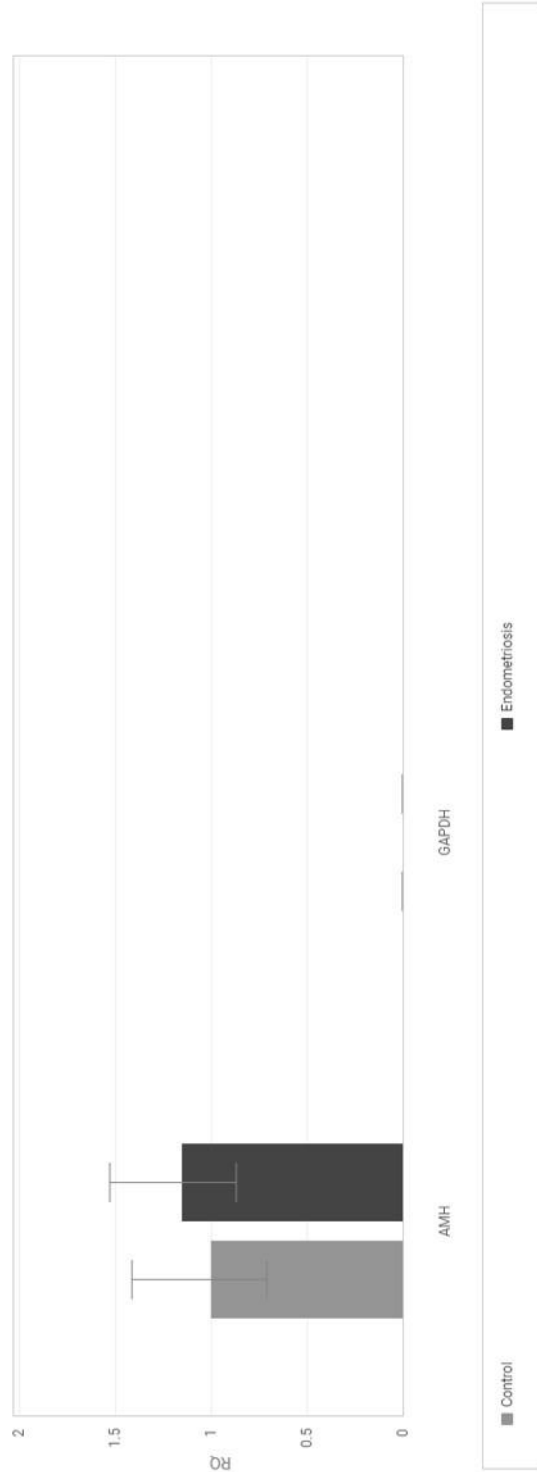
| Grupo        | <i>AMH</i> | <i>GAPDH</i> | $\Delta Ct$ | $\Delta\Delta Ct$ | Quantidade normalizada de <i>AMH</i><br>em relação ao Controle $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
|--------------|------------|--------------|-------------|-------------------|---|
| Controle     | 36,561     | 27,110       | 9,451       |                   |   |
|              | 34,654     | 26,956       | 7,697       |                   |   |
|              | 36,800     | 29,993       | 6,807       |                   |   |
|              | 35,057     | 28,129       | 6,929       |                   |   |
|              | 36,491     | 27,436       | 9,055       |                   |   |
|              | 35,044     | 25,274       | 9,770       |                   |   |
|              | 36,832     | 29,629       | 7,203       |                   |   |
|              | 35,340     | 30,480       | 4,860       |                   |   |
|              | 37,207     | 28,622       | 8,585       |                   |   |
|              | 36,499     | 28,665       | 7,834       |                   |   |
|              | 35,406     | 26,267       | 9,140       |                   |   |
|              | 35,220     | 27,857       | 7,363       |                   |   |
|              | 36,740     | 28,653       | 8,087       |                   |   |
|              | 35,016     | 24,919       | 10,097      |                   |   |
|              | 32,444     | 24,983       | 7,461       |                   |   |
| 34,359       | 25,602     | 8,756        |             |                   |   |
| Média        |            |              | 8,07±1,34   | 0,00              | 1,00  |
| Endometriose | 33,962     | 25,127       | 8,835       |                   |   |
|              | 33,674     | 25,015       | 8,659       |                   |   |
|              | 31,054     | 24,696       | 6,358       |                   |   |
|              | 36,231     | 29,386       | 6,845       |                   |   |
|              | 33,451     | 25,525       | 7,926       |                   |   |
|              | 34,818     | 27,860       | 6,958       |                   |   |
|              | 32,582     | 24,254       | 8,328       |                   |   |
|              | 33,336     | 24,437       | 8,899       |                   |   |
|              | 35,448     | 27,616       | 7,832       |                   |   |
|              | 36,456     | 28,062       | 8,394       |                   |   |
| Média        |            |              | 7,90±0,90   | -0,16             | 1,12  |

 $\Delta Ct = Ct$  médio *AMH* -  $Ct$  médio *GAPDH* (média  $\pm$  desvio-padrão) $\Delta\Delta Ct =$  média  $\Delta Ct$  - média  $\Delta Ct$  Controle

## Gene alvo: **AMH** (continuação)

Relative Quantification App - Thermo Fisher

| Target | Biological Group | $\Delta$ Ct Mean | $\Delta$ Ct SE | F-Factor | $\Delta$ $\Delta$ Ct | $\Delta$ $\Delta$ Ct - F $\sigma$ | $\Delta$ $\Delta$ Ct + F $\sigma$ | RQ    | RQ Min | RQ Max | Corrected P-Value |
|--------|------------------|------------------|----------------|----------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------|--------|--------|-------------------|
| AMH    | Control          | 9.221            | 0.246          | 2.026    | 0.000                | -0.498                            | 0.498                             | 1.000 | 0.708  | 1.412  | 1.000             |
| AMH    | Endometriosis    | 9.018            | 0.198          | 2.060    | -0.203               | -0.610                            | 0.204                             | 1.151 | 0.868  | 1.527  | 1.000             |
| GAPDH  | Control          | -                | -              | -        | -                    | -                                 | -                                 | -     | -      | -      | -                 |
| GAPDH  | Endometriosis    | -                | -              | -        | -                    | -                                 | -                                 | -     | -      | -      | -                 |



## Anexo 7

Gene alvo: *BMP-6*Dados de expressão gênica de *BMP-6* e *GAPDH* para os grupos em estudo.

| Grupo | n  | <i>BMP-6</i> |        |               |          | <i>GAPDH</i> |        |         |          |
|-------|----|--------------|--------|---------------|----------|--------------|--------|---------|----------|
|       |    | Ct1          | Ct2    | Ct3           | Ct médio | Ct1          | Ct2    | Ct3     | Ct médio |
| 1     | 1  | 32,746       | 32,834 | 32,810        | 32,797   | 28,973       | 29,184 | 29,382  | 29,180   |
| 1     | 2  | 31,914       | 32,282 | 31,504        | 31,900   | 27,270       | 27,454 | 27,542  | 27,422   |
| 1     | 3  | 31,511       | 30,872 | 31,354        | 31,245   | 27,070       | 27,154 | 27,375  | 27,199   |
| 1     | 4  | 36,202       | 34,556 | Indeterminado | 35,379   | 30,003       | 29,926 | Omitido | 29,964   |
| 1     | 5  | 34,971       | 33,721 | 35,336        | 34,676   | 28,155       | 28,451 | 28,419  | 28,342   |
| 1     | 6  | 32,294       | 31,940 | 31,928        | 32,054   | 27,632       | 27,756 | 27,794  | 27,727   |
| 1     | 7  | 31,391       | 32,250 | 32,240        | 31,960   | 25,540       | 25,545 | 25,499  | 25,528   |
| 1     | 8  | 32,908       | 32,780 | 32,805        | 32,831   | 29,735       | 29,868 | 29,872  | 29,825   |
| 1     | 9  | 34,547       | 34,838 | 34,292        | 34,559   | 30,654       | 30,824 | 30,810  | 30,762   |
| 1     | 10 | 35,719       | 35,524 | Indeterminado | 35,621   | 28,707       | 28,406 | Omitido | 28,556   |
| 1     | 11 | 35,263       | 35,976 | Indeterminado | 35,620   | 28,643       | 29,032 | Omitido | 28,838   |
| 1     | 12 | 33,413       | 34,182 | 33,485        | 33,693   | 26,644       | 26,562 | 26,679  | 26,628   |
| 1     | 13 | 31,895       | 31,613 | 31,519        | 31,676   | 28,130       | 28,155 | 28,143  | 28,142   |
| 1     | 14 | 33,999       | 33,240 | 33,840        | 33,693   | 28,773       | 28,568 | 28,837  | 28,726   |
| 1     | 15 | 31,703       | 31,853 | 31,069        | 31,542   | 25,003       | 25,156 | 24,849  | 25,003   |
| 1     | 16 | 29,984       | 30,475 | 30,664        | 30,374   | 24,769       | 25,188 | 25,107  | 25,021   |
| 1     | 17 | 32,500       | 32,602 | 32,005        | 32,369   | 25,546       | 25,792 | 25,597  | 25,645   |
| 1     | 18 | 33,594       | 33,763 | 33,355        | 33,571   | 28,276       | 28,358 | 28,328  | 28,321   |
| 2     | 1  | 31,327       | 32,300 | 31,506        | 31,711   | 25,527       | 25,684 | 25,546  | 25,586   |
| 2     | 2  | 32,223       | 32,225 | 32,585        | 32,344   | 25,218       | 25,073 | 24,883  | 25,058   |
| 2     | 3  | 31,588       | 31,821 | 30,669        | 31,359   | 24,484       | 24,459 | 23,720  | 24,221   |
| 2     | 4  | 37,506       | 35,431 | 35,629        | 36,189   | 29,746       | 29,774 | 29,545  | 29,688   |
| 2     | 5  | 31,816       | 31,735 | 31,493        | 31,681   | 25,714       | 25,914 | 25,411  | 25,680   |
| 2     | 6  | 33,640       | 32,941 | 33,136        | 33,239   | 28,247       | 28,318 | 28,052  | 28,206   |
| 2     | 7  | 30,483       | 30,222 | 30,674        | 30,460   | 24,535       | 24,499 | 24,218  | 24,418   |
| 2     | 8  | 31,327       | 31,387 | 31,130        | 31,281   | 24,680       | 24,748 | 24,698  | 24,709   |
| 2     | 9  | 33,393       | 33,890 | 33,459        | 33,581   | 27,364       | 26,959 | 28,051  | 27,458   |
| 2     | 10 | 33,372       | 33,841 | 33,805        | 33,672   | 27,851       | 28,208 | 28,204  | 28,087   |

Grupo 1 = Controle, Grupo 2 = Endometriose

**Gene alvo: *BMP-6* (continuação)**Cálculos de expressão gênica relativa para *BMP-6* - método  $\Delta\Delta Ct$ .

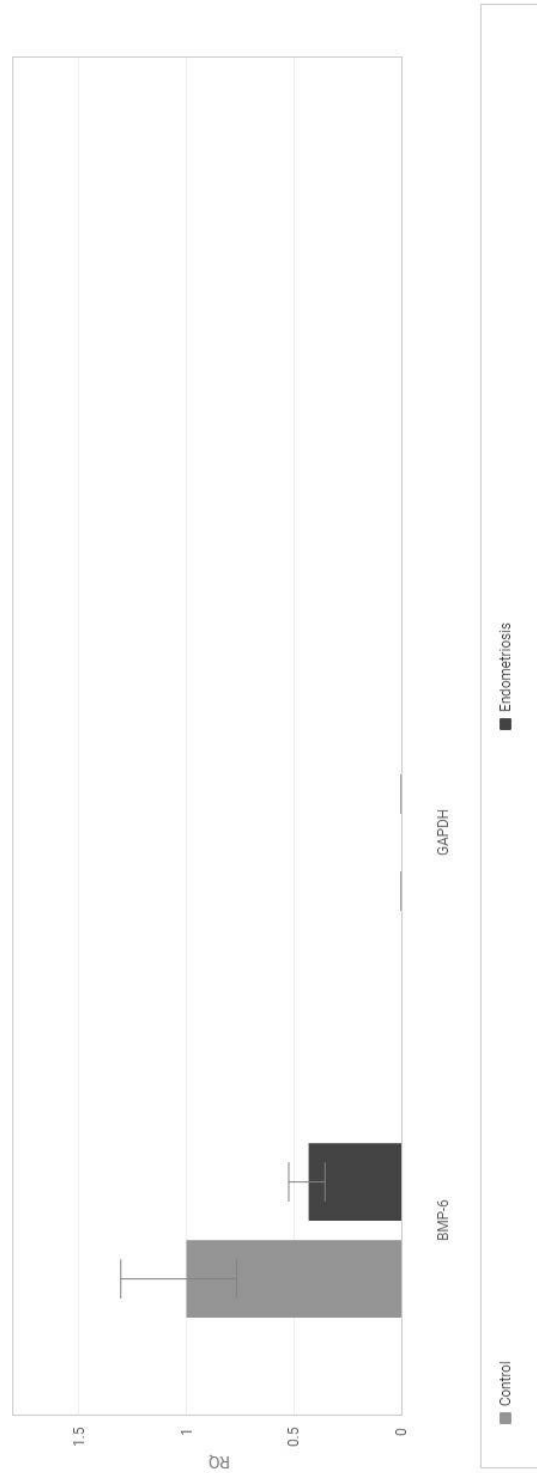
| Grupo        | <i>BMP-6</i> | <i>GAPDH</i> | $\Delta Ct$ | $\Delta\Delta Ct$ | Quantidade normalizada de <i>BMP-6</i><br>em relação ao Controle $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------------|---|
| Controle     | 32,797       | 29,180       | 3,617       |                   |   |
|              | 31,900       | 27,422       | 4,478       |                   |   |
|              | 31,245       | 27,199       | 4,046       |                   |   |
|              | 35,379       | 29,964       | 5,415       |                   |   |
|              | 34,676       | 28,342       | 6,334       |                   |   |
|              | 32,054       | 27,727       | 4,326       |                   |   |
|              | 31,960       | 25,528       | 6,433       |                   |   |
|              | 32,831       | 29,825       | 3,006       |                   |   |
|              | 34,559       | 30,762       | 3,797       |                   |   |
|              | 35,621       | 28,556       | 7,065       |                   |   |
|              | 35,620       | 28,838       | 6,782       |                   |   |
|              | 33,693       | 26,628       | 7,065       |                   |   |
|              | 31,676       | 28,142       | 3,533       |                   |   |
|              | 33,693       | 28,726       | 4,967       |                   |   |
|              | 31,542       | 25,003       | 6,539       |                   |   |
|              | 30,374       | 25,021       | 5,353       |                   |   |
| 32,369       | 25,645       | 6,724        |             |                   |   |
| 33,571       | 28,321       | 5,250        |             |                   |   |
| Média        |              |              | 5,26±1,35   | 0,00              | 1,00  |
| Endometriose | 31,711       | 25,586       | 6,125       |                   |   |
|              | 32,344       | 25,058       | 7,286       |                   |   |
|              | 31,359       | 24,221       | 7,138       |                   |   |
|              | 36,189       | 29,688       | 6,500       |                   |   |
|              | 31,681       | 25,680       | 6,002       |                   |   |
|              | 33,239       | 28,206       | 5,033       |                   |   |
|              | 30,460       | 24,418       | 6,042       |                   |   |
|              | 31,281       | 24,709       | 6,572       |                   |   |
|              | 33,581       | 27,458       | 6,123       |                   |   |
| 33,672       | 28,087       | 5,585        |             |                   |   |
| Média        |              |              | 6,24±0,67   | 0,98              | 0,507   |

 $\Delta Ct = Ct$  médio *BMP-6* -  $Ct$  médio *GAPDH* (média  $\pm$  desvio-padrão) $\Delta\Delta Ct =$  média  $\Delta Ct$  - média  $\Delta Ct$  Controle

**Gene alvo: *BMP-6* (continuação)**

Relative Quantification App - Thermo Fisher

| Target | Biological Group | $\Delta$ CT Mean | $\Delta$ CT SE | F-Factor | $\Delta$ CT | $\Delta$ CT - F <sub>0</sub> | $\Delta$ CT + F <sub>0</sub> | RQ    | RQ Min | RQ Max | Corrected P-Value |
|--------|------------------|------------------|----------------|----------|-------------|------------------------------|------------------------------|-------|--------|--------|-------------------|
| BMP-6  | Control          | 6.646            | 0.191          | 2.012    | 0.000       | -0.385                       | 0.385                        | 1.000 | 0.766  | 1.306  | 1.000             |
| BMP-6  | Endometriosis    | 7.859            | 0.138          | 2.037    | 1.213       | 0.933                        | 1.494                        | 0.431 | 0.355  | 0.524  | 0.013             |
| GAPDH  | Control          | -                | -              | -        | -           | -                            | -                            | -     | -      | -      | -                 |
| GAPDH  | Endometriosis    | -                | -              | -        | -           | -                            | -                            | -     | -      | -      | -                 |



## Anexo 8

### Gene alvo: *GDF-9*

Dados de expressão gênica de *GDF-9* e *GAPDH* para os grupos em estudo.

| Grupo | n  | <i>GDF-9</i>  |               |               |               | <i>GAPDH</i> |         |         |          |
|-------|----|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------|---------|----------|
|       |    | Ct1           | Ct2           | Ct3           | Ct médio      | Ct1          | Ct2     | Ct3     | Ct médio |
| 1     | 1  | 36,461        | Indeterminado | Indeterminado | 36,461        | 28,868       | Omitido | Omitido | 28,868   |
| 1     | 2  | 36,694        | 36,999        | Indeterminado | 36,847        | 27,637       | 27,521  | Omitido | 27,579   |
| 1     | 3  | 37,394        | 36,711        | 36,618        | 36,907        | 26,706       | 26,741  | 26,863  | 26,770   |
| 1     | 4  | 35,454        | Indeterminado | Indeterminado | 35,454        | 30,014       | Omitido | Omitido | 30,014   |
| 1     | 5  | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Omitido      | Omitido | Omitido | Omitido  |
| 1     | 6  | 36,365        | 36,758        | Indeterminado | 36,561        | 27,274       | 27,464  | Omitido | 27,369   |
| 1     | 7  | 34,832        | Indeterminado | Indeterminado | 34,832        | 25,175       | Omitido | Omitido | 25,175   |
| 1     | 8  | 36,654        | Indeterminado | Indeterminado | 36,654        | 29,473       | Omitido | Omitido | 29,473   |
| 1     | 9  | 36,153        | 37,153        | 35,966        | 36,424        | 30,404       | 30,427  | 30,268  | 30,367   |
| 1     | 10 | 35,402        | Indeterminado | Indeterminado | 35,402        | 29,202       | Omitido | Omitido | 29,202   |
| 1     | 11 | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Omitido      | Omitido | Omitido | Omitido  |
| 1     | 12 | 35,414        | 35,107        | 34,875        | 35,132        | 26,249       | 26,297  | 26,340  | 26,295   |
| 1     | 13 | 35,327        | 36,703        | Indeterminado | 36,015        | 27,640       | 27,749  | Omitido | 27,694   |
| 1     | 14 | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Omitido      | Omitido | Omitido | Omitido  |
| 1     | 15 | 34,273        | 36,330        | 34,453        | 35,019        | 24,651       | 24,784  | 24,625  | 24,687   |
| 1     | 16 | 35,701        | 36,857        | Indeterminado | 36,279        | 24,709       | 24,921  | Omitido | 24,815   |
| 1     | 17 | 36,594        | 37,568        | 36,657        | 36,940        | 25,319       | 25,276  | 25,212  | 25,269   |
| 1     | 18 | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Omitido      | Omitido | Omitido | Omitido  |
| 2     | 1  | 36,504        | 36,331        | Indeterminado | 36,417        | 25,063       | 25,203  | Omitido | 25,133   |
| 2     | 2  | 35,514        | 35,763        | 34,760        | 35,346        | 24,960       | 24,791  | 24,757  | 24,836   |
| 2     | 3  | 37,004        | 35,329        | 35,952        | 36,095        | 25,257       | 25,373  | 25,017  | 25,216   |
| 2     | 4  | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Omitido      | Omitido | Omitido | Omitido  |
| 2     | 5  | 36,443        | 37,544        | Indeterminado | 36,993        | 25,362       | 25,222  | Omitido | 25,292   |
| 2     | 6  | 37,035        | 36,258        | 34,931        | 36,075        | 27,883       | 27,803  | 27,618  | 27,768   |
| 2     | 7  | 36,853        | 35,088        | 34,234        | 35,392        | 23,957       | 23,996  | 23,808  | 23,920   |
| 2     | 8  | 35,255        | Indeterminado | Indeterminado | 35,255        | 24,642       | Omitido | Omitido | 24,642   |
| 2     | 9  | 36,789        | Indeterminado | Indeterminado | 36,789        | 27,572       | Omitido | Omitido | 27,572   |
| 2     | 10 | 36,231        | 35,595        | Indeterminado | 35,913        | 28,085       | 28,021  | Omitido | 28,053   |

Grupo 1 = Controle, Grupo 2 = Endometriose

**Gene alvo: *GDF-9* (continuação)**Cálculos de expressão gênica relativa para *GDF-9* - método  $\Delta\Delta Ct$ .

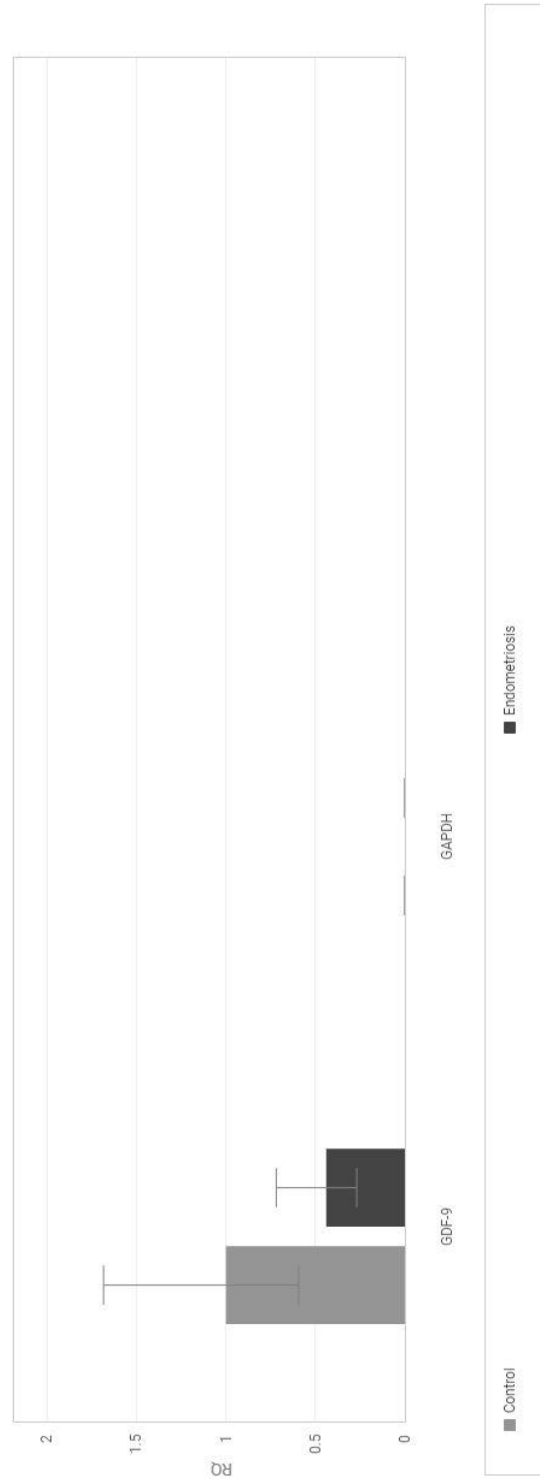
| Grupo        | <i>GDF-9</i> | <i>GAPDH</i> | $\Delta Ct$ | $\Delta\Delta Ct$ | Quantidade normalizada de <i>GDF-9</i><br>em relação ao Controle $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------------|---|
| Controle     | 36,461       | 28,868       | 7,593       |                   |   |
|              | 36,847       | 27,579       | 9,267       |                   |   |
|              | 36,907       | 26,770       | 10,137      |                   |   |
|              | 35,454       | 30,014       | 5,440       |                   |   |
|              | 36,561       | 27,369       | 9,193       |                   |   |
|              | 34,832       | 25,175       | 9,657       |                   |   |
|              | 36,654       | 29,473       | 7,181       |                   |   |
|              | 36,424       | 30,367       | 6,058       |                   |   |
|              | 35,402       | 29,202       | 6,200       |                   |   |
|              | 35,132       | 26,295       | 8,836       |                   |   |
|              | 36,015       | 27,694       | 8,321       |                   |   |
|              | 35,019       | 24,687       | 10,332      |                   |   |
|              | 36,279       | 24,815       | 11,464      |                   |   |
|              | 36,940       | 25,269       | 11,671      |                   |   |
| Média        |              |              | 8,67±1,96   | 0,00              | 1,00  |
| Endometriose | 36,417       | 25,133       | 11,284      |                   |   |
|              | 35,346       | 24,836       | 10,510      |                   |   |
|              | 36,095       | 25,216       | 10,880      |                   |   |
|              | 36,993       | 25,292       | 11,701      |                   |   |
|              | 36,075       | 27,768       | 8,307       |                   |   |
|              | 35,392       | 23,920       | 11,471      |                   |   |
|              | 35,255       | 24,642       | 10,613      |                   |   |
|              | 36,789       | 27,572       | 9,217       |                   |   |
| 35,913       | 28,053       | 7,860        |             |                   |   |
| Média        |              |              | 10,20±1,40  | 1,53              | 0,356   |

 $\Delta Ct = Ct \text{ médio } GDF-9 - Ct \text{ médio } GAPDH$  (média  $\pm$  desvio-padrão) $\Delta\Delta Ct = \text{média } \Delta Ct - \text{média } \Delta Ct \text{ Controle}$

## Gene alvo: *GDF-9* (continuação)

Relative Quantification App - Thermo Fisher

| Target | Biological Group | $\Delta$ CT Mean | $\Delta$ CT SE | F-Factor | $\Delta$ CT | $\Delta$ CT - F <sub>0</sub> | $\Delta$ CT + F <sub>0</sub> | RQ    | RQ Min | RQ Max | Corrected P-Value |
|--------|------------------|------------------|----------------|----------|-------------|------------------------------|------------------------------|-------|--------|--------|-------------------|
| GDF-9  | Control          | 10.227           | 0.366          | 2.052    | 0.000       | -0.752                       | 0.752                        | 1.000 | 0.594  | 1.684  | 1.000             |
| GDF-9  | Endometriosis    | 11.413           | 0.339          | 2.093    | 1.186       | 0.477                        | 1.895                        | 0.440 | 0.269  | 0.718  | 0.084             |
| GAPDH  | Control          | -                | -              | -        | -           | -                            | -                            | -     | -      | -      | -                 |
| GAPDH  | Endometriosis    | -                | -              | -        | -           | -                            | -                            | -     | -      | -      | -                 |





## Anexo 9

### Gene alvo: *INHA*

Dados de expressão gênica de *INHA* e *GAPDH* para os grupos em estudo.

| Grupo | n  | <i>INHA</i> |        |        |          | <i>GAPDH</i> |        |        |          |
|-------|----|-------------|--------|--------|----------|--------------|--------|--------|----------|
|       |    | Ct1         | Ct2    | Ct3    | Ct médio | Ct1          | Ct2    | Ct3    | Ct médio |
| 1     | 1  | 30,954      | 31,006 | 31,103 | 31,021   | 28,906       | 28,980 | 29,141 | 29,009   |
| 1     | 2  | 28,367      | 28,080 | 28,312 | 28,253   | 27,423       | 27,195 | 27,515 | 27,378   |
| 1     | 3  | 29,147      | 29,167 | 29,073 | 29,129   | 26,769       | 26,854 | 26,894 | 26,839   |
| 1     | 4  | 33,303      | 33,240 | 33,461 | 33,335   | 30,074       | 30,022 | 30,118 | 30,071   |
| 1     | 5  | 31,100      | 31,151 | 30,851 | 31,034   | 28,176       | 28,360 | 28,091 | 28,209   |
| 1     | 6  | 28,132      | 28,183 | 28,192 | 28,169   | 27,410       | 27,488 | 27,456 | 27,452   |
| 1     | 7  | 27,774      | 27,771 | 27,918 | 27,821   | 25,180       | 25,129 | 25,295 | 25,202   |
| 1     | 8  | 30,076      | 30,235 | 30,335 | 30,215   | 29,224       | 29,179 | 29,507 | 29,303   |
| 1     | 9  | 30,670      | 30,345 | 30,574 | 30,530   | 30,412       | 30,314 | 30,392 | 30,373   |
| 1     | 10 | 31,720      | 31,573 | 31,654 | 31,649   | 29,300       | 29,178 | 29,172 | 29,217   |
| 1     | 11 | 32,320      | 32,216 | 32,060 | 32,199   | 29,394       | 29,356 | 29,418 | 29,389   |
| 1     | 12 | 29,655      | 29,619 | 29,615 | 29,630   | 26,494       | 26,451 | 26,598 | 26,514   |
| 1     | 13 | 29,521      | 29,488 | 29,356 | 29,455   | 27,761       | 27,748 | 27,624 | 27,711   |
| 1     | 14 | 29,364      | 29,483 | 29,442 | 29,430   | 28,249       | 28,135 | 28,278 | 28,221   |
| 1     | 15 | 27,801      | 27,757 | 27,709 | 27,756   | 24,660       | 24,746 | 24,613 | 24,673   |
| 1     | 16 | 28,670      | 28,976 | 28,630 | 28,758   | 25,305       | 25,637 | 25,327 | 25,423   |
| 1     | 17 | 28,478      | 28,419 | 28,482 | 28,460   | 25,294       | 25,386 | 25,449 | 25,376   |
| 1     | 18 | 30,816      | 30,778 | 30,770 | 30,788   | 28,653       | 28,764 | 28,613 | 28,677   |
| 2     | 1  | 28,452      | 28,497 | 28,456 | 28,468   | 25,230       | 25,299 | 25,293 | 25,274   |
| 2     | 2  | 28,080      | 28,092 | 28,089 | 28,087   | 24,933       | 25,005 | 24,774 | 24,904   |
| 2     | 3  | 27,995      | 28,051 | 27,988 | 28,012   | 25,262       | 25,435 | 25,095 | 25,264   |
| 2     | 4  | 30,624      | 30,425 | 30,546 | 30,532   | 29,665       | 29,502 | 29,507 | 29,558   |
| 2     | 5  | 28,347      | 28,241 | 28,130 | 28,239   | 25,555       | 25,579 | 25,246 | 25,460   |
| 2     | 6  | 29,127      | 29,037 | 29,076 | 29,080   | 27,858       | 27,831 | 27,820 | 27,836   |
| 2     | 7  | 28,708      | 28,795 | 28,611 | 28,705   | 23,942       | 24,084 | 23,804 | 23,943   |
| 2     | 8  | 28,458      | 28,421 | 28,437 | 28,439   | 24,730       | 24,823 | 24,687 | 24,747   |
| 2     | 9  | 31,195      | 31,213 | 31,242 | 31,217   | 27,595       | 27,639 | 27,707 | 27,647   |
| 2     | 10 | 29,273      | 29,311 | 29,338 | 29,307   | 28,122       | 28,172 | 28,117 | 28,137   |

Grupo 1 = Controle, Grupo 2 = Endometriose

**Gene alvo: *INHA* (continuação)**Cálculos de expressão gênica relativa para *INHA* - método  $\Delta\Delta Ct$ .

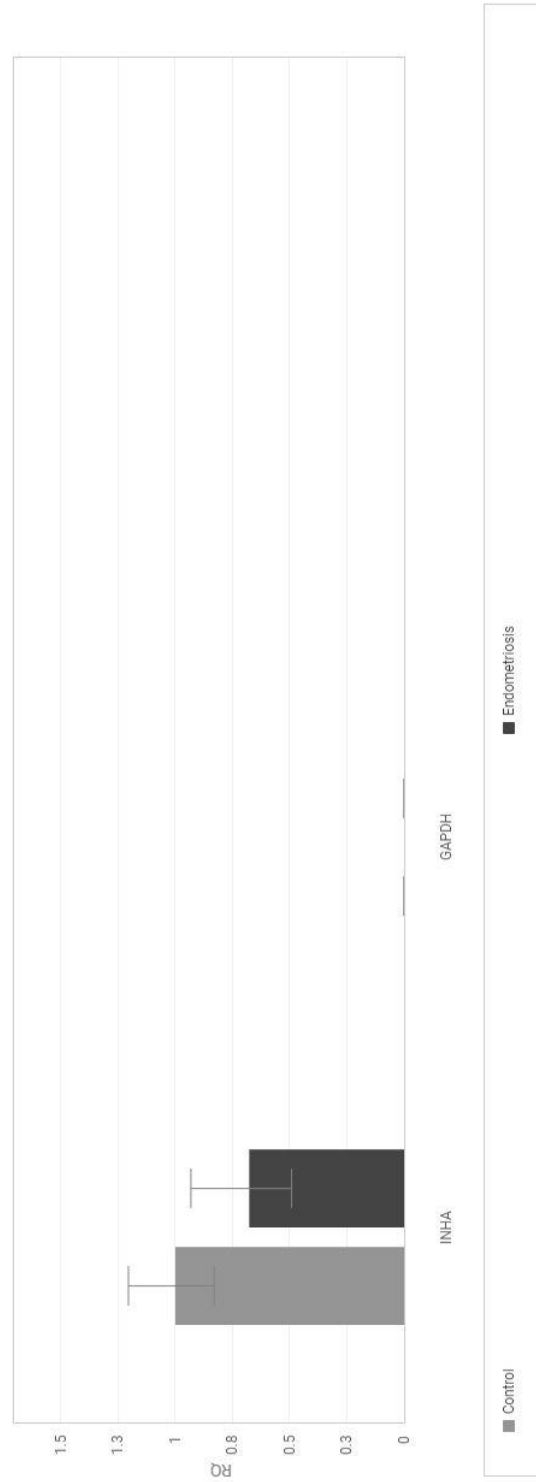
| Grupo         | <i>INHA</i> | <i>GAPDH</i> | $\Delta Ct$ | $\Delta\Delta Ct$ | Quantidade normalizada de <i>INHA</i><br>em relação ao Controle $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
|---------------|-------------|--------------|-------------|-------------------|--|
| Controle      | 31,021      | 29,009       | 2,012       |                   |  |
|               | 28,253      | 27,378       | 0,875       |                   |  |
|               | 29,129      | 26,839       | 2,290       |                   |  |
|               | 33,335      | 30,071       | 3,264       |                   |  |
|               | 31,034      | 28,209       | 2,825       |                   |  |
|               | 28,169      | 27,452       | 0,717       |                   |  |
|               | 27,821      | 25,202       | 2,620       |                   |  |
|               | 30,215      | 29,303       | 0,912       |                   |  |
|               | 30,530      | 30,373       | 0,157       |                   |  |
|               | 31,649      | 29,217       | 2,432       |                   |  |
|               | 32,199      | 29,389       | 2,810       |                   |  |
|               | 29,630      | 26,514       | 3,116       |                   |  |
|               | 29,455      | 27,711       | 1,744       |                   |  |
|               | 29,430      | 28,221       | 1,209       |                   |  |
|               | 27,756      | 24,673       | 3,083       |                   |  |
|               | 28,758      | 25,423       | 3,336       |                   |  |
|               | 28,460      | 25,376       | 3,083       |                   |  |
| 30,788        | 28,677      | 2,111        |             |                   |  |
| Média         |             |              | 2,14±0,99   | 0,00              | 1,00   |
| Endometriosis | 28,468      | 25,274       | 3,194       |                   |  |
|               | 28,087      | 24,904       | 3,183       |                   |  |
|               | 28,012      | 25,264       | 2,748       |                   |  |
|               | 30,532      | 29,558       | 0,974       |                   |  |
|               | 28,239      | 25,460       | 2,779       |                   |  |
|               | 29,080      | 27,836       | 1,244       |                   |  |
|               | 28,705      | 23,943       | 4,761       |                   |  |
|               | 28,439      | 24,747       | 3,692       |                   |  |
|               | 31,217      | 27,647       | 3,570       |                   |  |
| 29,307        | 28,137      | 1,170        |             |                   |  |
| Média         |             |              | 2,73±1,24   | 0,59              | 0,664  |

 $\Delta Ct = Ct \text{ médio } INHA - Ct \text{ médio } GAPDH \text{ (média } \pm \text{ desvio-padrão)}$  $\Delta\Delta Ct = \text{média } \Delta Ct - \text{média } \Delta Ct \text{ Controle}$

## Gene alvo: *INHA* (continuação)

Relative Quantification App - Thermo Fisher

| Target | Biological Group | $\Delta C_t$ Mean | $\Delta C_t$ SE | F-Factor | $\Delta \Delta C_t$ | $\Delta \Delta C_t - F_0$ | $\Delta \Delta C_t + F_0$ | RQ    | RQ Min | RQ Max | Corrected P-Value |
|--------|------------------|-------------------|-----------------|----------|---------------------|---------------------------|---------------------------|-------|--------|--------|-------------------|
| INHA   | Control          | 0.236             | 0.134           | 2.006    | 0.000               | -0.269                    | 0.269                     | 1.000 | 0.830  | 1.205  | 1.000             |
| INHA   | Endometriosis    | 0.799             | 0.225           | 2.045    | 0.563               | 0.102                     | 1.024                     | 0.677 | 0.492  | 0.932  | 0.494             |
| GAPDH  | Control          | -                 | -               | -        | -                   | -                         | -                         | -     | -      | -      | -                 |
| GAPDH  | Endometriosis    | -                 | -               | -        | -                   | -                         | -                         | -     | -      | -      | -                 |



## Anexo 10

### Gene alvo: *INHBB*

Dados de expressão gênica de *INHBB* e *GAPDH* para os grupos em estudo.

| Grupo | n  | <i>INHBB</i> |        |        |          | <i>GAPDH</i> |        |        |          |
|-------|----|--------------|--------|--------|----------|--------------|--------|--------|----------|
|       |    | Ct1          | Ct2    | Ct3    | Ct médio | Ct1          | Ct2    | Ct3    | Ct médio |
| 1     | 1  | 32,163       | 32,040 | 32,257 | 32,153   | 29,309       | 29,141 | 29,340 | 29,263   |
| 1     | 2  | 28,160       | 28,391 | 28,424 | 28,325   | 27,195       | 27,471 | 27,521 | 27,395   |
| 1     | 3  | 31,376       | 31,458 | 31,623 | 31,486   | 27,341       | 27,358 | 27,510 | 27,403   |
| 1     | 4  | 35,418       | 35,073 | 35,103 | 35,198   | 29,920       | 30,086 | 30,003 | 30,003   |
| 1     | 5  | 31,088       | 31,071 | 31,221 | 31,127   | 28,100       | 28,387 | 28,381 | 28,289   |
| 1     | 6  | 28,559       | 28,635 | 28,446 | 28,547   | 27,282       | 27,497 | 27,351 | 27,377   |
| 1     | 7  | 30,708       | 31,048 | 30,870 | 30,875   | 25,445       | 25,747 | 25,618 | 25,603   |
| 1     | 8  | 31,532       | 31,417 | 31,517 | 31,489   | 30,037       | 29,966 | 30,039 | 30,014   |
| 1     | 9  | 30,422       | 30,832 | 30,849 | 30,701   | 30,604       | 30,839 | 30,831 | 30,758   |
| 1     | 10 | 33,681       | 33,563 | 34,071 | 33,772   | 29,045       | 28,958 | 29,119 | 29,041   |
| 1     | 11 | 33,170       | 33,687 | 33,364 | 33,407   | 29,199       | 29,183 | 29,274 | 29,218   |
| 1     | 12 | 30,324       | 30,300 | 30,534 | 30,386   | 26,744       | 26,751 | 26,926 | 26,807   |
| 1     | 13 | 29,185       | 29,412 | 29,474 | 29,357   | 28,061       | 28,243 | 28,286 | 28,197   |
| 1     | 14 | 32,118       | 32,314 | 32,091 | 32,174   | 28,834       | 28,808 | 28,889 | 28,844   |
| 1     | 15 | 29,923       | 30,059 | 30,290 | 30,091   | 24,913       | 25,153 | 25,278 | 25,115   |
| 1     | 16 | 28,829       | 29,045 | 29,090 | 28,988   | 25,107       | 25,213 | 25,292 | 25,204   |
| 1     | 17 | 32,073       | 32,365 | 32,225 | 32,221   | 25,666       | 26,009 | 25,997 | 25,891   |
| 1     | 18 | 32,221       | 32,145 | 32,472 | 32,279   | 28,210       | 28,431 | 28,653 | 28,431   |
| 2     | 1  | 30,960       | 30,935 | 31,155 | 31,017   | 25,690       | 25,801 | 25,604 | 25,698   |
| 2     | 2  | 32,307       | 32,327 | 32,614 | 32,416   | 25,333       | 25,497 | 25,309 | 25,380   |
| 2     | 3  | 30,626       | 30,438 | 30,676 | 30,580   | 24,736       | 24,868 | 24,804 | 24,803   |
| 2     | 4  | 32,426       | 32,936 | 33,131 | 32,831   | 29,662       | 29,960 | 29,555 | 29,726   |
| 2     | 5  | 29,948       | 30,047 | 30,210 | 30,068   | 25,655       | 25,956 | 25,739 | 25,783   |
| 2     | 6  | 30,380       | 30,994 | 30,911 | 30,762   | 27,871       | 28,440 | 28,249 | 28,187   |
| 2     | 7  | 29,369       | 29,456 | 29,615 | 29,480   | 24,354       | 24,588 | 24,437 | 24,460   |
| 2     | 8  | 30,881       | 30,883 | 30,867 | 30,877   | 24,780       | 24,917 | 24,855 | 24,851   |
| 2     | 9  | 32,202       | 32,214 | 32,268 | 32,228   | 27,713       | 27,778 | 27,942 | 27,811   |
| 2     | 10 | 30,969       | 31,114 | 30,875 | 30,986   | 28,221       | 28,500 | 28,220 | 28,314   |

Grupo 1 = Controle, Grupo 2 = Endometriose

**Gene alvo: *INHBB* (continuação)**Cálculos de expressão gênica relativa para *INHBB* - método  $\Delta\Delta Ct$ .

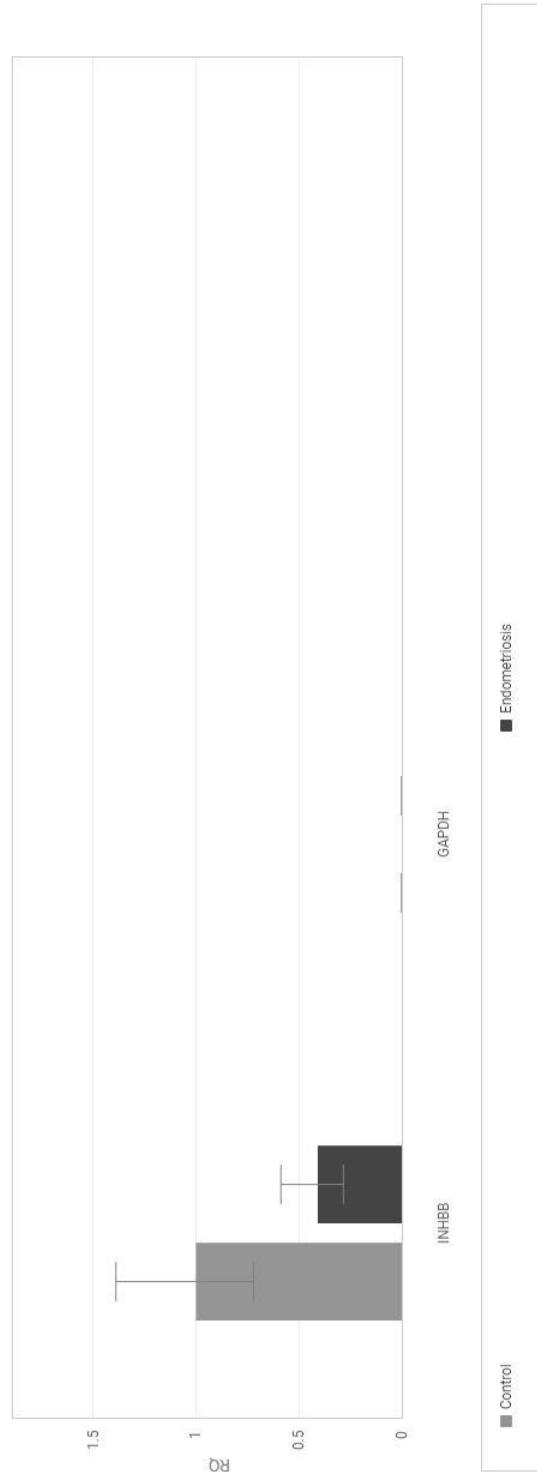
| Grupo        | <i>INHBB</i> | <i>GAPDH</i> | $\Delta Ct$ | $\Delta\Delta Ct$ | Quantidade normalizada de <i>INHBB</i><br>em relação ao Controle $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------------|---|
| Controle     | 32,153       | 29,263       | 2,890       |                   |   |
|              | 28,325       | 27,395       | 0,930       |                   |   |
|              | 31,486       | 27,403       | 4,083       |                   |   |
|              | 35,198       | 30,003       | 5,195       |                   |   |
|              | 31,127       | 28,289       | 2,837       |                   |   |
|              | 28,547       | 27,377       | 1,170       |                   |   |
|              | 30,875       | 25,603       | 5,272       |                   |   |
|              | 31,489       | 30,014       | 1,474       |                   |   |
|              | 30,701       | 30,758       | -0,057      |                   |   |
|              | 33,772       | 29,041       | 4,731       |                   |   |
|              | 33,407       | 29,218       | 4,188       |                   |   |
|              | 30,386       | 26,807       | 3,579       |                   |   |
|              | 29,357       | 28,197       | 1,161       |                   |   |
|              | 32,174       | 28,844       | 3,331       |                   |   |
|              | 30,091       | 25,115       | 4,976       |                   |   |
|              | 28,988       | 25,204       | 3,784       |                   |   |
|              | 32,221       | 25,891       | 6,330       |                   |   |
| 32,279       | 28,431       | 3,848        |             |                   |   |
| Média        |              |              | 3,31±1,77   | 0,00              | 1,00  |
| Endometriose | 31,017       | 25,698       | 5,319       |                   |   |
|              | 32,416       | 25,380       | 7,036       |                   |   |
|              | 30,580       | 24,803       | 5,777       |                   |   |
|              | 32,831       | 29,726       | 3,105       |                   |   |
|              | 30,068       | 25,783       | 4,285       |                   |   |
|              | 30,762       | 28,187       | 2,575       |                   |   |
|              | 29,480       | 24,460       | 5,020       |                   |   |
|              | 30,877       | 24,851       | 6,026       |                   |   |
|              | 32,228       | 27,811       | 4,417       |                   |   |
|              | 30,986       | 28,314       | 2,673       |                   |   |
| Média        |              |              | 4,62±1,50   | 1,31              | 0,403   |

 $\Delta Ct = Ct$  médio *INHBB* -  $Ct$  médio *GAPDH* (média  $\pm$  desvio-padrão) $\Delta\Delta Ct =$  média  $\Delta Ct$  - média  $\Delta Ct$  Controle

**Gene alvo: *INHBB* (continuação)**

Relative Quantification App - Thermo Fisher

| Target | Biological Group | $\Delta$ CT Mean | $\Delta$ CT SE | F-Factor | $\Delta$ CT | $\Delta$ CT - F $\sigma$ | $\Delta$ CT + F $\sigma$ | RQ    | RQ Min | RQ Max | Corrected P-Value |
|--------|------------------|------------------|----------------|----------|-------------|--------------------------|--------------------------|-------|--------|--------|-------------------|
| INHA   | Control          | 0.236            | 0.134          | 2.006    | 0.000       | -0.269                   | 0.269                    | 1.000 | 0.830  | 1.205  | 1.000             |
| INHA   | Endometriosis    | 0.799            | 0.225          | 2.045    | 0.563       | 0.102                    | 1.024                    | 0.677 | 0.492  | 0.932  | 0.494             |
| GAPDH  | Control          | -                | -              | -        | -           | -                        | -                        | -     | -      | -      | -                 |
| GAPDH  | Endometriosis    | -                | -              | -        | -           | -                        | -                        | -     | -      | -      | -                 |



## Anexo 11

Gene alvo: *TGFβ3*Dados de expressão gênica de *TGFβ3* e *GAPDH* para os grupos em estudo.

| Grupo | n  | <i>TGFβ3</i>  |               |               |               | <i>GAPDH</i> |         |         |          |
|-------|----|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------|---------|----------|
|       |    | Ct1           | Ct2           | Ct3           | Ct médio      | Ct1          | Ct2     | Ct3     | Ct médio |
| 1     | 1  | 36,438        | 36,716        | 37,267        | 36,807        | 28,616       | 28,809  | 28,812  | 28,746   |
| 1     | 2  | 33,830        | 33,920        | 33,305        | 33,685        | 26,843       | 27,133  | 27,002  | 26,992   |
| 1     | 3  | 35,337        | 36,130        | 34,376        | 35,281        | 26,467       | 26,583  | 26,693  | 26,581   |
| 1     | 4  | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Omitido      | Omitido | Omitido | Omitido  |
| 1     | 5  | 36,351        | 36,704        | Indeterminado | 36,528        | 27,898       | 27,945  | Omitido | 27,921   |
| 1     | 6  | 33,735        | 34,672        | 34,000        | 34,136        | 27,384       | 27,514  | 27,454  | 27,451   |
| 1     | 7  | 33,964        | 35,507        | 36,771        | 35,414        | 25,021       | 25,151  | 25,164  | 25,112   |
| 1     | 8  | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Omitido      | Omitido | Omitido | Omitido  |
| 1     | 9  | 36,770        | 34,892        | Indeterminado | 35,831        | 30,362       | 30,449  | Omitido | 30,405   |
| 1     | 10 | 36,586        | 36,606        | 35,867        | 36,353        | 29,112       | 28,959  | 29,355  | 29,142   |
| 1     | 11 | 36,384        | 35,539        | Indeterminado | 35,961        | 29,152       | 28,976  | Omitido | 29,064   |
| 1     | 12 | 35,449        | 35,393        | 35,528        | 35,456        | 26,187       | 26,295  | 26,460  | 26,314   |
| 1     | 13 | 34,815        | 35,689        | 34,723        | 35,076        | 27,345       | 27,549  | 27,522  | 27,472   |
| 1     | 14 | 34,434        | 35,480        | Indeterminado | 34,957        | 28,149       | 28,359  | Omitido | 28,254   |
| 1     | 15 | 34,585        | 33,952        | 32,909        | 33,815        | 24,427       | 24,326  | 24,441  | 24,398   |
| 1     | 16 | 32,781        | 34,830        | 32,897        | 33,502        | 24,924       | 25,561  | 24,811  | 25,099   |
| 1     | 17 | 35,177        | 34,299        | 34,265        | 34,580        | 25,090       | 25,174  | 25,246  | 25,170   |
| 1     | 18 | 34,995        | Indeterminado | Indeterminado | 34,995        | 28,070       | Omitido | Omitido | 28,070   |
| 2     | 1  | 34,193        | 33,885        | 33,219        | 33,766        | 24,995       | 25,160  | 25,126  | 25,094   |
| 2     | 2  | 34,632        | 34,857        | 32,887        | 34,125        | 24,990       | 24,790  | 24,673  | 24,818   |
| 2     | 3  | 35,484        | 35,852        | 34,161        | 35,165        | 25,044       | 25,345  | 25,020  | 25,136   |
| 2     | 4  | 36,230        | Indeterminado | Indeterminado | 36,230        | 29,585       | Omitido | Omitido | 29,585   |
| 2     | 5  | 33,191        | 33,311        | 32,999        | 33,167        | 25,237       | 25,232  | 24,883  | 25,117   |
| 2     | 6  | 36,771        | 34,702        | 36,284        | 35,919        | 27,857       | 27,671  | 27,673  | 27,734   |
| 2     | 7  | 33,695        | 35,378        | 33,337        | 34,136        | 23,826       | 23,917  | 23,484  | 23,742   |
| 2     | 8  | 32,588        | 35,218        | 32,874        | 33,560        | 24,094       | 24,531  | 24,492  | 24,372   |
| 2     | 9  | 35,786        | 36,213        | Indeterminado | 35,999        | 27,507       | 27,553  | Omitido | 27,530   |
| 2     | 10 | 35,871        | 34,811        | 33,735        | 34,805        | 28,024       | 27,419  | 27,479  | 27,641   |

Grupo 1 = Controle, Grupo 2 = Endometriose

**Gene alvo: *TGFβ3* (continuação)**Cálculos de expressão gênica relativa para *TGFβ3* - método  $\Delta\Delta Ct$ .

| Grupo        | <i>TGFβ3</i> | <i>GAPDH</i> | $\Delta Ct$ | $\Delta\Delta Ct$ | Quantidade normalizada de <i>TGFβ3</i><br>em relação ao Controle $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------------|---|
| Controle     | 36,807       | 28,746       | 8,061       |                   |   |
|              | 33,685       | 26,992       | 6,693       |                   |   |
|              | 35,281       | 26,581       | 8,700       |                   |   |
|              | 36,528       | 27,921       | 8,606       |                   |   |
|              | 34,136       | 27,451       | 6,685       |                   |   |
|              | 35,414       | 25,112       | 10,302      |                   |   |
|              | 35,831       | 30,405       | 5,426       |                   |   |
|              | 36,353       | 29,142       | 7,211       |                   |   |
|              | 35,961       | 29,064       | 6,897       |                   |   |
|              | 35,456       | 26,314       | 9,142       |                   |   |
|              | 35,076       | 27,472       | 7,604       |                   |   |
|              | 34,957       | 28,254       | 6,703       |                   |   |
|              | 33,815       | 24,398       | 9,417       |                   |   |
|              | 33,502       | 25,099       | 8,404       |                   |   |
|              | 34,580       | 25,170       | 9,410       |                   |   |
| 34,995       | 28,070       | 6,924        |             |                   |   |
| Média        |              |              | 7,88±1,32   | 0,00              | 1,00  |
| Endometriose | 33,766       | 25,094       | 8,672       |                   |   |
|              | 34,125       | 24,818       | 9,308       |                   |   |
|              | 35,165       | 25,136       | 10,029      |                   |   |
|              | 36,230       | 29,585       | 6,645       |                   |   |
|              | 33,167       | 25,117       | 8,049       |                   |   |
|              | 35,919       | 27,734       | 8,185       |                   |   |
|              | 34,136       | 23,742       | 10,394      |                   |   |
|              | 33,560       | 24,372       | 9,188       |                   |   |
|              | 35,999       | 27,530       | 8,469       |                   |   |
|              | 34,805       | 27,641       | 7,165       |                   |   |
| Média        |              |              | 8,61±1,18   | 0,72              | 0,607   |

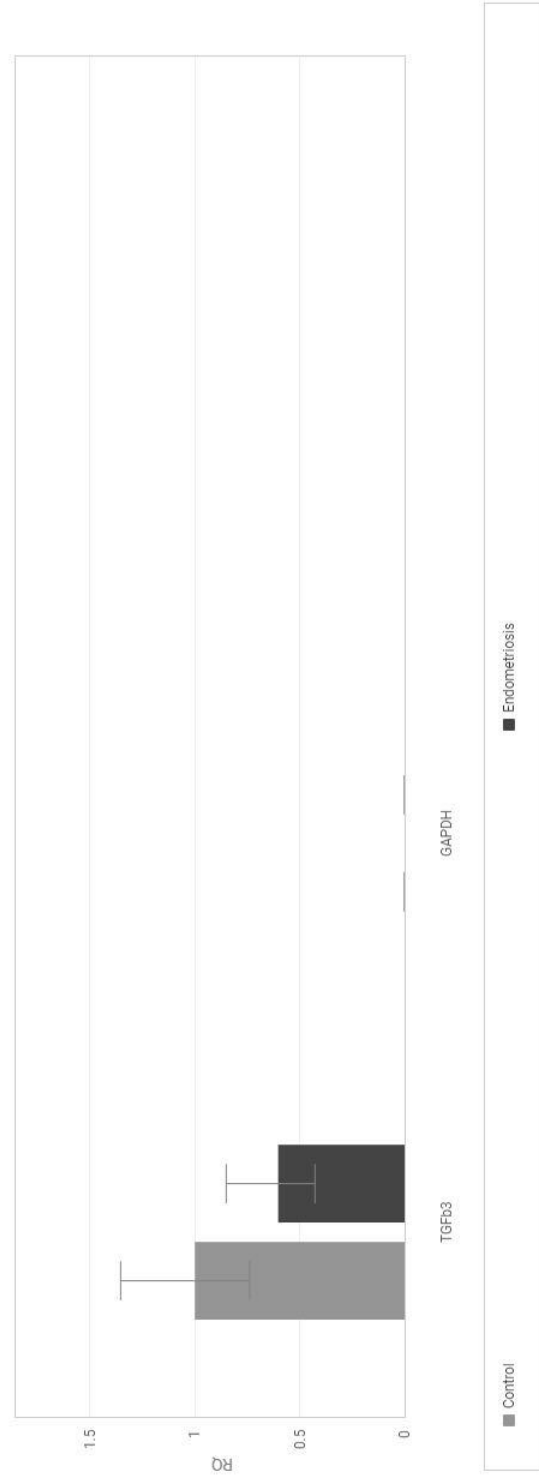
 $\Delta Ct = Ct \text{ médio } TGF\beta 3 - Ct \text{ médio } GAPDH$  (média  $\pm$  desvio-padrão) $\Delta\Delta Ct = \text{média } \Delta Ct - \text{média } \Delta Ct \text{ Controle}$



## Gene alvo: *TGFβ3* (continuação)

Relative Quantification App - Thermo Fisher

| Target | Biological Group | ΔCt Mean | ΔCt SE | F-Factor | ΔΔCt  | ΔΔCt - F0 | ΔΔCt + F0 | RQ    | RQ Min | RQ Max | Corrected P-Value |
|--------|------------------|----------|--------|----------|-------|-----------|-----------|-------|--------|--------|-------------------|
| TGFβ3  | Control          | 9.308    | 0.216  | 2.020    | 0.000 | -0.437    | 0.437     | 1.000 | 0.739  | 1.354  | 1.000             |
| TGFβ3  | Endometriosis    | 10.038   | 0.242  | 2.056    | 0.730 | 0.234     | 1.227     | 0.603 | 0.427  | 0.851  | 0.320             |
| GAPDH  | Control          | -        | -      | -        | -     | -         | -         | -     | -      | -      | -                 |
| GAPDH  | Endometriosis    | -        | -      | -        | -     | -         | -         | -     | -      | -      | -                 |



## Anexo 12

### Gene alvo: *AMHR2*

Dados de expressão gênica de *AMHR2* e *GAPDH* para os grupos em estudo.

| Grupo | n  | <i>AMHR2</i>  |               |               |               | <i>GAPDH</i> |         |         |          |
|-------|----|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------|---------|----------|
|       |    | Ct1           | Ct2           | Ct3           | Ct médio      | Ct1          | Ct2     | Ct3     | Ct médio |
| 1     | 1  | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Omitido      | Omitido | Omitido | Omitido  |
| 1     | 2  | 36,161        | 34,686        | 35,844        | 35,563        | 27,539       | 27,640  | 27,652  | 27,610   |
| 1     | 3  | 33,100        | 32,982        | 36,168        | 34,083        | 26,839       | 26,824  | 26,917  | 26,860   |
| 1     | 4  | 35,085        | 36,160        | Indeterminado | 35,623        | 29,961       | 30,021  | Omitido | 29,991   |
| 1     | 5  | 35,692        | 36,362        | 34,498        | 35,517        | 28,205       | 28,271  | 28,087  | 28,188   |
| 1     | 6  | 34,215        | 35,652        | Indeterminado | 34,934        | 27,457       | 27,453  | Omitido | 27,455   |
| 1     | 7  | 36,052        | 34,641        | 34,238        | 34,977        | 25,137       | 25,215  | 25,228  | 25,193   |
| 1     | 8  | 35,856        | 34,956        | 35,652        | 35,488        | 29,519       | 29,128  | 29,402  | 29,350   |
| 1     | 9  | 35,035        | 35,109        | 35,567        | 35,237        | 30,424       | 25,332  | 25,439  | 27,065   |
| 1     | 10 | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Omitido      | Omitido | Omitido | Omitido  |
| 1     | 11 | 37,012        | Indeterminado | Indeterminado | 37,012        | 29,301       | Omitido | Omitido | 29,301   |
| 1     | 12 | 34,549        | 34,938        | Indeterminado | 34,744        | 26,464       | 26,664  | Omitido | 26,564   |
| 1     | 13 | 36,610        | 35,761        | 34,924        | 35,765        | 27,726       | 27,830  | 27,703  | 27,753   |
| 1     | 14 | 35,904        | 34,275        | 36,058        | 35,413        | 28,314       | 28,378  | 28,327  | 28,340   |
| 1     | 15 | 33,580        | 33,758        | 35,318        | 34,219        | 24,682       | 24,807  | 24,651  | 24,713   |
| 1     | 16 | 33,398        | 32,937        | 33,166        | 33,167        | 25,290       | 25,353  | 25,408  | 25,350   |
| 1     | 17 | 35,091        | Indeterminado | Indeterminado | 35,091        | 25,352       | Omitido | Omitido | 25,352   |
| 1     | 18 | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Indeterminado | Omitido      | Omitido | Omitido | Omitido  |
| 2     | 1  | 34,951        | 36,132        | Indeterminado | 35,542        | 25,288       | 25,224  | Omitido | 25,256   |
| 2     | 2  | 34,911        | 33,666        | 34,522        | 34,366        | 24,930       | 24,887  | 24,788  | 24,868   |
| 2     | 3  | 32,585        | 32,260        | 32,217        | 32,354        | 25,266       | 25,414  | 25,144  | 25,274   |
| 2     | 4  | 35,484        | 33,606        | 34,388        | 34,493        | 29,600       | 29,663  | 29,583  | 29,615   |
| 2     | 5  | 33,887        | 33,243        | 33,333        | 33,488        | 25,418       | 25,506  | 25,251  | 25,392   |
| 2     | 6  | 34,717        | 34,232        | Indeterminado | 34,474        | 27,880       | 27,923  | Omitido | 27,901   |
| 2     | 7  | 34,391        | 34,283        | 32,627        | 33,767        | 24,044       | 24,051  | 23,890  | 23,995   |
| 2     | 8  | 35,581        | 36,769        | Indet,        | 36,175        | 24,749       | 24,513  | Omitido | 24,631   |
| 2     | 9  | 34,451        | 34,524        | 33,547        | 34,174        | 27,674       | 27,627  | 27,638  | 27,646   |
| 2     | 10 | 35,162        | Indeterminado | Indeterminado | 35,162        | 27,995       | Omitido | Omitido | 27,995   |

Grupo 1 = Controle, Grupo 2 = Endometriose

**Gene alvo: *AMHR2* (continuação)**Cálculos de expressão gênica relativa para *AMHR2* - método  $\Delta\Delta Ct$ .

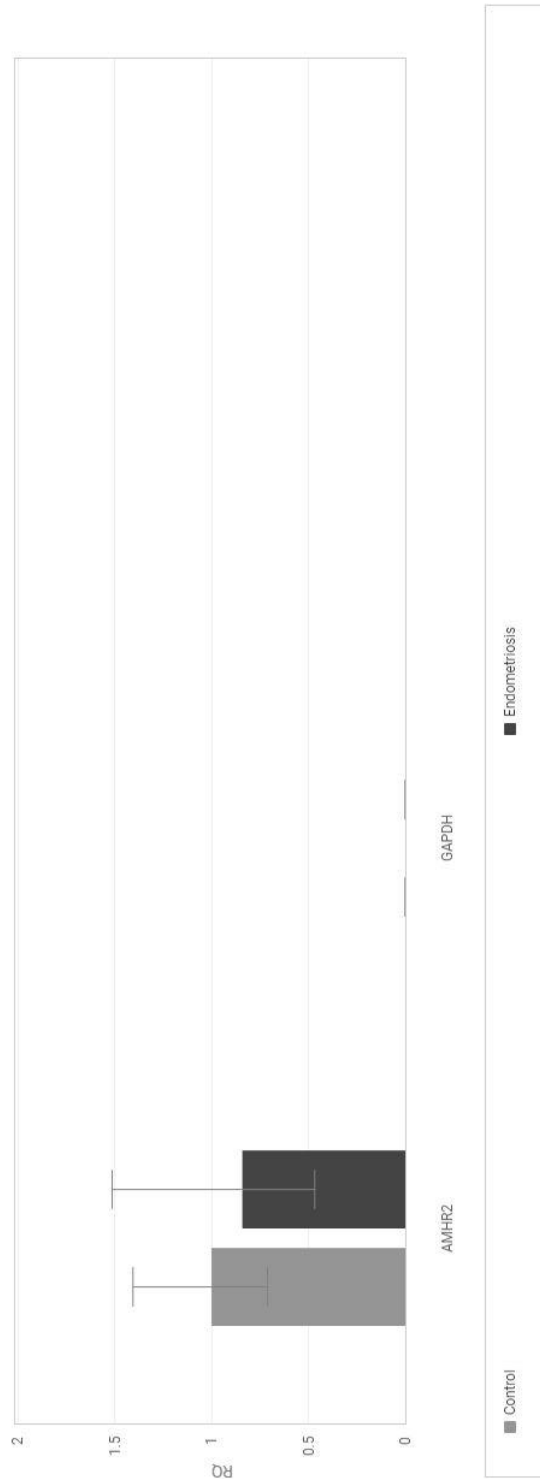
| Grupo        | <i>AMHR2</i> | <i>GAPDH</i> | $\Delta Ct$ | $\Delta\Delta Ct$ | Quantidade normalizada de <i>AMHR2</i><br>em relação ao Controle $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------------|---|
| Controle     | 35,563       | 27,610       | 7,953       |                   |   |
|              | 34,083       | 26,860       | 7,223       |                   |   |
|              | 35,623       | 29,991       | 5,632       |                   |   |
|              | 35,517       | 28,188       | 7,330       |                   |   |
|              | 34,934       | 27,455       | 7,479       |                   |   |
|              | 34,977       | 25,193       | 9,784       |                   |   |
|              | 35,488       | 29,350       | 6,138       |                   |   |
|              | 35,237       | 27,065       | 8,172       |                   |   |
|              | 37,012       | 29,301       | 7,711       |                   |   |
|              | 34,744       | 26,564       | 8,180       |                   |   |
|              | 35,765       | 27,753       | 8,012       |                   |   |
|              | 35,413       | 28,340       | 7,073       |                   |   |
|              | 34,219       | 24,713       | 9,506       |                   |   |
|              | 33,167       | 25,350       | 7,817       |                   |   |
|              | 35,091       | 25,352       | 9,740       |                   |   |
| Média        |              |              | 7,85±1,18   | 0,00              | 1,00  |
| Endometriose | 35,542       | 25,256       | 10,286      |                   |   |
|              | 34,366       | 24,868       | 9,498       |                   |   |
|              | 32,354       | 25,274       | 7,080       |                   |   |
|              | 34,493       | 29,615       | 4,878       |                   |   |
|              | 33,488       | 25,392       | 8,096       |                   |   |
|              | 34,474       | 27,901       | 6,573       |                   |   |
|              | 33,767       | 23,995       | 9,772       |                   |   |
|              | 36,175       | 24,631       | 11,544      |                   |   |
|              | 34,174       | 27,646       | 6,528       |                   |   |
|              | 35,162       | 27,995       | 7,167       |                   |   |
| Média        |              |              | 8,14±2,07   | 0,29              | 0,818   |

 $\Delta Ct = Ct$  médio *AMHR2* -  $Ct$  médio *GAPDH* (média  $\pm$  desvio-padrão) $\Delta\Delta Ct =$  média  $\Delta Ct$  - média  $\Delta Ct$  Controle

**Gene alvo: AMHR2 (continuação)**

Relative Quantification App - Thermo Fisher

| Target | Biological Group | $\Delta$ CT Mean | $\Delta$ CT SE | F-Factor | $\Delta$ CT | $\Delta$ CT - F $\sigma$ | $\Delta$ CT + F $\sigma$ | RQ    | RQ Min | RQ Max | Corrected P-Value |
|--------|------------------|------------------|----------------|----------|-------------|--------------------------|--------------------------|-------|--------|--------|-------------------|
| AMHR2  | Control          | 9.174            | 0.242          | 2.026    | 0.000       | -0.491                   | 0.491                    | 1.000 | 0.711  | 1.405  | 1.000             |
| AMHR2  | Endometriosis    | 9.423            | 0.410          | 2.064    | 0.250       | -0.598                   | 1.097                    | 0.841 | 0.468  | 1.513  | 0.990             |
| GAPDH  | Control          | -                | -              | -        | -           | -                        | -                        | -     | -      | -      | -                 |
| GAPDH  | Endometriosis    | -                | -              | -        | -           | -                        | -                        | -     | -      | -      | -                 |



## Anexo 13

Gene alvo: *BMPR2*Dados de expressão gênica de *BMPR2* e *GAPDH* para os grupos em estudo.

| Grupo | n  | <i>BMPR2</i> |        |        |          | <i>GAPDH</i> |        |        |          |
|-------|----|--------------|--------|--------|----------|--------------|--------|--------|----------|
|       |    | Ct1          | Ct2    | Ct3    | Ct médio | Ct1          | Ct2    | Ct3    | Ct médio |
| 1     | 1  | 33,629       | 32,461 | 33,468 | 33,186   | 28,691       | 27,441 | 28,745 | 28,292   |
| 1     | 2  | 30,704       | 30,546 | 30,583 | 30,611   | 27,393       | 27,126 | 27,353 | 27,291   |
| 1     | 3  | 31,180       | 31,030 | 31,182 | 31,131   | 26,828       | 26,758 | 26,899 | 26,828   |
| 1     | 4  | 34,346       | 34,354 | 34,149 | 34,283   | 29,925       | 29,982 | 29,921 | 29,943   |
| 1     | 5  | 33,562       | 33,129 | 33,343 | 33,345   | 28,142       | 28,086 | 28,119 | 28,116   |
| 1     | 6  | 30,860       | 31,477 | 30,965 | 31,100   | 27,432       | 28,115 | 27,537 | 27,695   |
| 1     | 7  | 30,423       | 30,398 | 30,409 | 30,410   | 25,125       | 25,111 | 25,096 | 25,111   |
| 1     | 8  | 32,801       | 32,876 | 32,733 | 32,803   | 29,269       | 29,432 | 29,212 | 29,304   |
| 1     | 9  | 33,437       | 33,588 | 33,653 | 33,559   | 30,277       | 30,349 | 30,358 | 30,328   |
| 1     | 10 | 35,261       | 34,475 | 34,970 | 34,902   | 29,014       | 29,113 | 29,260 | 29,129   |
| 1     | 11 | 34,095       | 34,926 | 33,815 | 34,279   | 28,562       | 29,353 | 28,572 | 28,829   |
| 1     | 12 | 30,981       | 31,136 | 31,037 | 31,051   | 26,416       | 26,399 | 26,451 | 26,422   |
| 1     | 13 | 31,446       | 31,218 | 31,547 | 31,404   | 27,608       | 27,534 | 27,691 | 27,611   |
| 1     | 14 | 31,574       | 31,346 | 31,533 | 31,485   | 28,212       | 28,070 | 28,211 | 28,164   |
| 1     | 15 | 30,185       | 30,296 | 30,144 | 30,209   | 24,563       | 24,631 | 24,544 | 24,580   |
| 1     | 16 | 30,345       | 30,235 | 30,342 | 30,308   | 25,165       | 25,246 | 25,322 | 25,244   |
| 1     | 17 | 30,072       | 30,157 | 29,988 | 30,072   | 25,162       | 25,264 | 25,189 | 25,205   |
| 1     | 18 | 34,013       | 34,140 | 33,994 | 34,049   | 28,575       | 28,613 | 28,518 | 28,569   |
| 2     | 1  | 30,351       | 30,402 | 29,943 | 30,232   | 25,233       | 25,227 | 24,893 | 25,118   |
| 2     | 2  | 30,148       | 30,208 | 30,077 | 30,144   | 24,960       | 24,883 | 24,716 | 24,853   |
| 2     | 3  | 30,016       | 30,052 | 30,051 | 30,040   | 25,281       | 25,348 | 25,081 | 25,237   |
| 2     | 4  | 33,632       | 33,582 | 33,407 | 33,540   | 29,745       | 29,441 | 29,302 | 29,496   |
| 2     | 5  | 30,325       | 30,411 | 30,195 | 30,310   | 25,389       | 25,482 | 25,170 | 25,347   |
| 2     | 6  | 31,063       | 31,066 | 31,018 | 31,049   | 27,838       | 27,944 | 27,755 | 27,845   |
| 2     | 7  | 30,133       | 29,996 | 29,961 | 30,030   | 23,965       | 23,983 | 23,736 | 23,895   |
| 2     | 8  | 30,229       | 30,080 | 30,158 | 30,156   | 24,678       | 24,560 | 24,608 | 24,615   |
| 2     | 9  | 32,410       | 32,854 | 32,985 | 32,750   | 27,254       | 27,581 | 27,724 | 27,520   |
| 2     | 10 | 31,967       | 31,990 | 31,935 | 31,964   | 27,977       | 28,177 | 27,974 | 28,043   |

Grupo 1 = Controle, Grupo 2 = Endometriose

**Gene alvo: *BMP2* (continuação)**

Cálculos de expressão gênica relativa para *BMP2* - método  $\Delta\Delta Ct$ .

| Grupo        | <i>BMP2</i> | <i>GAPDH</i> | $\Delta Ct$ | $\Delta\Delta Ct$ | Quantidade normalizada de <i>BMP2</i><br>em relação ao Controle $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------------|--|
| Controle     | 33,186      | 28,292       | 4,894       |                   |  |
|              | 30,611      | 27,291       | 3,320       |                   |  |
|              | 31,131      | 26,828       | 4,302       |                   |  |
|              | 34,283      | 29,943       | 4,340       |                   |  |
|              | 33,345      | 28,116       | 5,229       |                   |  |
|              | 31,100      | 27,695       | 3,406       |                   |  |
|              | 30,410      | 25,111       | 5,299       |                   |  |
|              | 32,803      | 29,304       | 3,499       |                   |  |
|              | 33,559      | 30,328       | 3,231       |                   |  |
|              | 34,902      | 29,129       | 5,773       |                   |  |
|              | 34,279      | 28,829       | 5,450       |                   |  |
|              | 31,051      | 26,422       | 4,629       |                   |  |
|              | 31,404      | 27,611       | 3,793       |                   |  |
|              | 31,485      | 28,164       | 3,320       |                   |  |
|              | 30,209      | 24,580       | 5,629       |                   |  |
|              | 30,308      | 25,244       | 5,063       |                   |  |
|              | 30,072      | 25,205       | 4,867       |                   |  |
| 34,049       | 28,569      | 5,480        |             |                   |  |
| Média        |             |              | 4,53±0,90   | 0,00              | 1,00   |
| Endometriose | 30,232      | 25,118       | 5,114       |                   |  |
|              | 30,144      | 24,853       | 5,291       |                   |  |
|              | 30,040      | 25,237       | 4,803       |                   |  |
|              | 33,540      | 29,496       | 4,045       |                   |  |
|              | 30,310      | 25,347       | 4,963       |                   |  |
|              | 31,049      | 27,845       | 3,203       |                   |  |
|              | 30,030      | 23,895       | 6,135       |                   |  |
|              | 30,156      | 24,615       | 5,540       |                   |  |
|              | 32,750      | 27,520       | 5,229       |                   |  |
|              | 31,964      | 28,043       | 3,922       |                   |  |
| Média        |             |              | 4,82±0,87   | 0,29              | 0,818  |

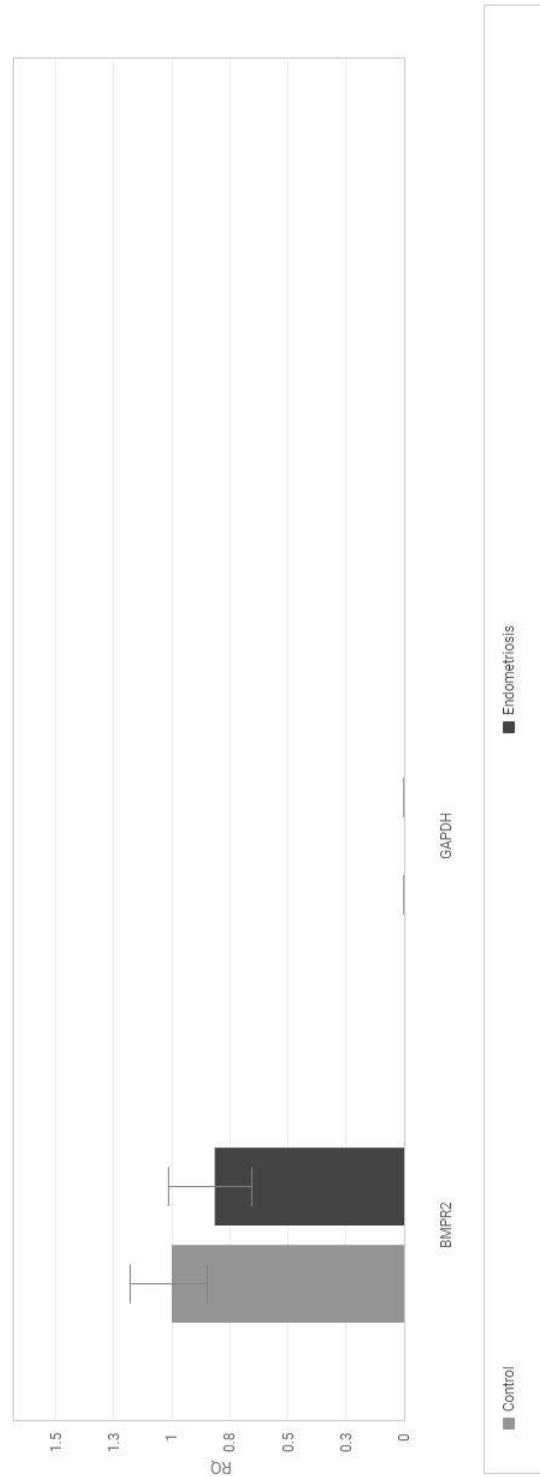
$\Delta Ct = Ct$  médio *BMP2* -  $Ct$  médio *GAPDH* (média  $\pm$  desvio-padrão)

$\Delta\Delta Ct =$  média  $\Delta Ct$  - média  $\Delta Ct$  Controle

Gene alvo: **BMPR2** (continuação)

Relative Quantification App - Thermo Fisher

| Target | Biological Group | $\Delta$ Ct Mean | $\Delta$ Ct SE | F-Factor | $\Delta$ $\Delta$ Ct | $\Delta$ $\Delta$ Ct - F <sub>0</sub> | $\Delta$ $\Delta$ Ct + F <sub>0</sub> | RQ    | RQ Min | RQ Max | Corrected P-Value |
|--------|------------------|------------------|----------------|----------|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------|--------|--------|-------------------|
| BMPR2  | Control          | 3.417            | 0.118          | 2.006    | 0.000                | -0.238                                | 0.238                                 | 1.000 | 0.848  | 1.179  | 1.000             |
| BMPR2  | Endometriosis    | 3.712            | 0.154          | 2.045    | 0.295                | -0.020                                | 0.610                                 | 0.815 | 0.655  | 1.014  | 0.802             |
| GAPDH  | Control          | -                | -              | -        | -                    | -                                     | -                                     | -     | -      | -      | -                 |
| GAPDH  | Endometriosis    | -                | -              | -        | -                    | -                                     | -                                     | -     | -      | -      | -                 |



## Anexo 14

Gene alvo: *TGF $\beta$ R3*Dados de expressão gênica de *TGF $\beta$ R3* e *GAPDH* para os grupos em estudo.

| Grupo | n  | <i>TGF<math>\beta</math>R3</i> |        |        |          | <i>GAPDH</i> |        |        |          |
|-------|----|--------------------------------|--------|--------|----------|--------------|--------|--------|----------|
|       |    | Ct1                            | Ct2    | Ct3    | Ct médio | Ct1          | Ct2    | Ct3    | Ct médio |
| 1     | 1  | 32,265                         | 32,484 | 32,717 | 32,489   | 28,917       | 29,106 | 29,283 | 29,102   |
| 1     | 2  | 28,772                         | 28,966 | 28,953 | 28,897   | 27,080       | 27,383 | 27,382 | 27,281   |
| 1     | 3  | 29,477                         | 29,600 | 29,574 | 29,550   | 27,308       | 27,294 | 27,350 | 27,317   |
| 1     | 4  | 32,484                         | 32,893 | 32,769 | 32,715   | 29,972       | 30,157 | 29,985 | 30,038   |
| 1     | 5  | 30,358                         | 30,627 | 30,181 | 30,389   | 28,212       | 28,614 | 27,843 | 28,223   |
| 1     | 6  | 28,801                         | 29,026 | 28,991 | 28,939   | 27,408       | 27,642 | 27,681 | 27,577   |
| 1     | 7  | 28,649                         | 28,941 | 28,748 | 28,780   | 25,354       | 25,584 | 25,458 | 25,465   |
| 1     | 8  | 31,112                         | 31,042 | 30,873 | 31,009   | 29,769       | 29,822 | 29,931 | 29,841   |
| 1     | 9  | 31,974                         | 32,120 | 32,028 | 32,041   | 30,754       | 30,843 | 30,744 | 30,780   |
| 1     | 10 | 31,342                         | 31,439 | 31,973 | 31,584   | 28,264       | 28,285 | 28,882 | 28,477   |
| 1     | 11 | 32,572                         | 32,515 | 32,881 | 32,656   | 28,644       | 28,760 | 28,863 | 28,756   |
| 1     | 12 | 30,243                         | 29,817 | 30,119 | 30,060   | 26,538       | 26,190 | 26,499 | 26,409   |
| 1     | 13 | 30,125                         | 30,339 | 30,264 | 30,243   | 28,043       | 28,184 | 28,166 | 28,131   |
| 1     | 14 | 28,949                         | 29,124 | 29,036 | 29,037   | 28,487       | 28,679 | 28,685 | 28,617   |
| 1     | 15 | 28,949                         | 29,194 | 29,181 | 29,108   | 24,920       | 25,119 | 25,154 | 25,064   |
| 1     | 16 | 29,152                         | 29,204 | 29,430 | 29,262   | 24,910       | 25,069 | 25,240 | 25,073   |
| 1     | 17 | 29,342                         | 29,359 | 29,658 | 29,453   | 25,691       | 25,726 | 25,925 | 25,781   |
| 1     | 18 | 32,335                         | 32,571 | 32,722 | 32,543   | 28,154       | 28,264 | 28,396 | 28,271   |
| 2     | 1  | 28,181                         | 28,518 | 28,328 | 28,342   | 25,359       | 25,738 | 25,126 | 25,408   |
| 2     | 2  | 27,288                         | 27,427 | 27,465 | 27,393   | 25,059       | 25,298 | 25,286 | 25,215   |
| 2     | 3  | 27,915                         | 28,452 | 28,385 | 28,251   | 23,780       | 24,560 | 24,451 | 24,264   |
| 2     | 4  | 31,474                         | 31,975 | 31,868 | 31,772   | 29,255       | 29,847 | 29,697 | 29,600   |
| 2     | 5  | 29,275                         | 29,548 | 29,495 | 29,439   | 25,599       | 25,883 | 25,670 | 25,718   |
| 2     | 6  | 28,977                         | 29,218 | 29,099 | 29,098   | 28,060       | 28,349 | 28,203 | 28,204   |
| 2     | 7  | 29,270                         | 29,706 | 29,577 | 29,518   | 24,187       | 24,597 | 24,356 | 24,380   |
| 2     | 8  | 29,216                         | 29,464 | 29,255 | 29,312   | 24,499       | 24,753 | 24,712 | 24,655   |
| 2     | 9  | 31,296                         | 31,289 | 31,231 | 31,272   | 27,723       | 27,659 | 27,937 | 27,773   |
| 2     | 10 | 28,735                         | 28,737 | 28,755 | 28,742   | 27,796       | 28,039 | 28,046 | 27,961   |

Grupo 1 = Controle, Grupo 2 = Endometriose



**Gene alvo: *TGF $\beta$ R3* (continuação)**Cálculos de expressão gênica relativa para *TGF $\beta$ R3* - método  $\Delta\Delta Ct$ .

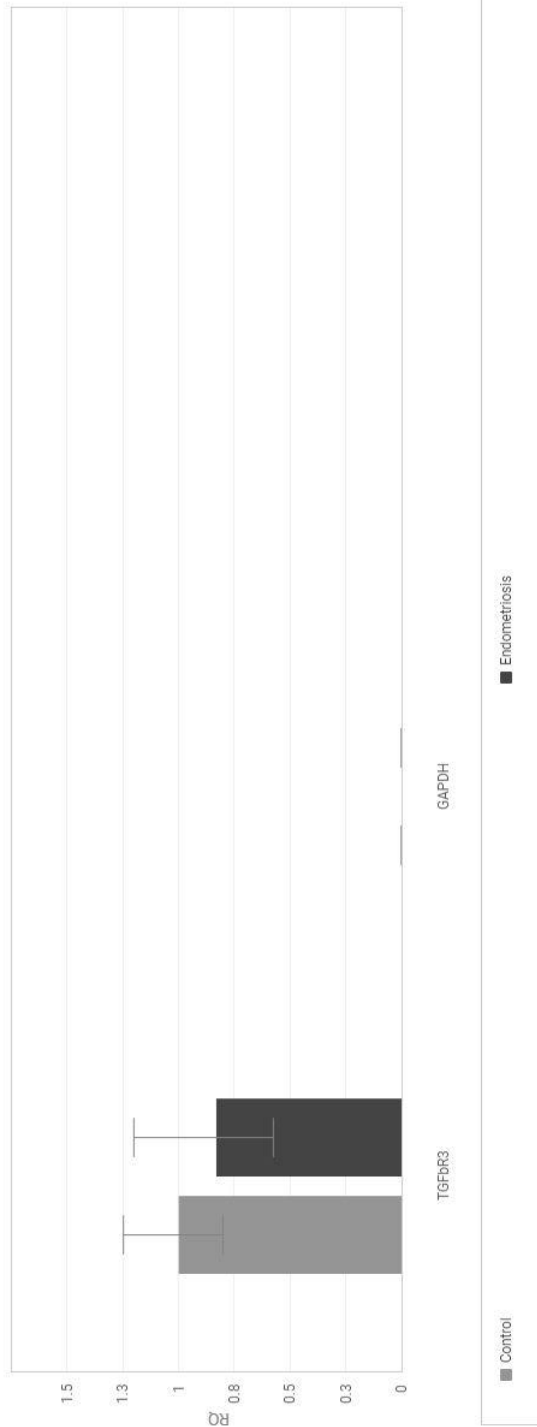
| Grupo        | <i>TGF<math>\beta</math>R3</i> | <i>GAPDH</i> | $\Delta Ct$     | $\Delta\Delta Ct$ | Quantidade normalizada de <i>TGF<math>\beta</math>R3</i><br>em relação ao Controle $2^{\Delta\Delta Ct}$ |
|--------------|--------------------------------|--------------|-----------------|-------------------|--|
| Controle     | 32,489                         | 29,102       | 3,387           |                   |  |
|              | 28,897                         | 27,281       | 1,616           |                   |  |
|              | 29,550                         | 27,317       | 2,233           |                   |  |
|              | 32,715                         | 30,038       | 2,677           |                   |  |
|              | 30,389                         | 28,223       | 2,166           |                   |  |
|              | 28,939                         | 27,577       | 1,362           |                   |  |
|              | 28,780                         | 25,465       | 3,314           |                   |  |
|              | 31,009                         | 29,841       | 1,168           |                   |  |
|              | 32,041                         | 30,780       | 1,261           |                   |  |
|              | 31,584                         | 28,477       | 3,107           |                   |  |
|              | 32,656                         | 28,756       | 3,901           |                   |  |
|              | 30,060                         | 26,409       | 3,650           |                   |  |
|              | 30,243                         | 28,131       | 2,111           |                   |  |
|              | 29,037                         | 28,617       | 0,420           |                   |  |
|              | 29,108                         | 25,064       | 4,044           |                   |  |
|              | 29,262                         | 25,073       | 4,189           |                   |  |
|              | 29,453                         | 25,781       | 3,673           |                   |  |
| 32,543       | 28,271                         | 4,271        |                 |                   |  |
| Média        |                                |              | 2,70 $\pm$ 1,19 | 0,00              | 1,00   |
| Endometriose | 28,342                         | 25,408       | 2,934           |                   |  |
|              | 27,393                         | 25,215       | 2,179           |                   |  |
|              | 28,251                         | 24,264       | 3,987           |                   |  |
|              | 31,772                         | 29,600       | 2,172           |                   |  |
|              | 29,439                         | 25,718       | 3,722           |                   |  |
|              | 29,098                         | 28,204       | 0,894           |                   |  |
|              | 29,518                         | 24,380       | 5,138           |                   |  |
|              | 29,312                         | 24,655       | 4,657           |                   |  |
|              | 31,272                         | 27,773       | 3,499           |                   |  |
| 28,742       | 27,961                         | 0,782        |                 |                   |  |
| Média        |                                |              | 3,00 $\pm$ 1,48 | 0,30              | 0,812  |

 $\Delta Ct = Ct$  médio *TGF $\beta$ R3* -  $Ct$  médio *GAPDH* (média  $\pm$  desvio-padrão) $\Delta\Delta Ct =$  média  $\Delta Ct$  - média  $\Delta Ct$  Controle

## Gene alvo: *TGF $\beta$ 3* (continuação)

Relative Quantification App - Thermo Fisher

| Target        | Biological Group | $\Delta$ Ct Mean | $\Delta$ Ct SE | F-Factor | $\Delta$ $\Delta$ Ct | $\Delta$ $\Delta$ Ct - F $\theta$ | $\Delta$ $\Delta$ Ct + F $\theta$ | RQ    | RQ Min | RQ Max | Corrected P-Value |
|---------------|------------------|------------------|----------------|----------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------|--------|--------|-------------------|
| TGF $\beta$ 3 | Control          | 1.638            | 0.159          | 2.006    | 0.000                | -0.320                            | 0.320                             | 1.000 | 0.801  | 1.248  | 1.000             |
| TGF $\beta$ 3 | Endometriosis    | 1.905            | 0.260          | 2.045    | 0.267                | -0.264                            | 0.798                             | 0.831 | 0.575  | 1.201  | 1.000             |
| GAPDH         | Endometriosis    | -                | -              | -        | -                    | -                                 | -                                 | -     | -      | -      | -                 |
| GAPDH         | Control          | -                | -              | -        | -                    | -                                 | -                                 | -     | -      | -      | -                 |



## Anexo 15

### Gene alvo: *SMAD3*

Dados de expressão gênica de *SMAD3* e *GAPDH* para os grupos em estudo.

| Grupo | n  | <i>SMAD3</i> |        |        |          | <i>GAPDH</i> |        |        |          |
|-------|----|--------------|--------|--------|----------|--------------|--------|--------|----------|
|       |    | Ct1          | Ct2    | Ct3    | Ct médio | Ct1          | Ct2    | Ct3    | Ct médio |
| 1     | 1  | 35,239       | 35,567 | 35,021 | 35,276   | 29,144       | 29,399 | 29,474 | 29,339   |
| 1     | 2  | 31,247       | 31,766 | 31,768 | 31,594   | 27,187       | 27,650 | 27,644 | 27,493   |
| 1     | 3  | 32,230       | 32,622 | 32,583 | 32,478   | 27,316       | 27,392 | 27,424 | 27,377   |
| 1     | 4  | 34,981       | 35,939 | 35,381 | 35,433   | 30,132       | 29,953 | 30,055 | 30,046   |
| 1     | 5  | 34,274       | 34,582 | 34,452 | 34,436   | 28,472       | 28,561 | 28,639 | 28,557   |
| 1     | 6  | 32,439       | 32,327 | 32,329 | 32,365   | 27,772       | 27,953 | 27,741 | 27,822   |
| 1     | 7  | 30,639       | 30,535 | 30,629 | 30,601   | 25,845       | 25,723 | 25,792 | 25,786   |
| 1     | 8  | 32,531       | 32,676 | 32,634 | 32,614   | 30,058       | 30,079 | 29,988 | 30,041   |
| 1     | 9  | 33,774       | 34,175 | 34,424 | 34,124   | 30,701       | 30,910 | 30,921 | 30,844   |
| 1     | 10 | 34,733       | 35,014 | 35,136 | 34,961   | 28,527       | 28,491 | 28,695 | 28,571   |
| 1     | 11 | 33,867       | 33,926 | 33,803 | 33,866   | 28,537       | 28,844 | 28,624 | 28,669   |
| 1     | 12 | 32,060       | 31,713 | 31,759 | 31,844   | 26,702       | 26,812 | 26,662 | 26,725   |
| 1     | 13 | 33,078       | 33,179 | 33,282 | 33,179   | 28,148       | 28,352 | 28,391 | 28,297   |
| 1     | 14 | 33,893       | 34,347 | 34,593 | 34,278   | 28,704       | 28,942 | 28,987 | 28,878   |
| 1     | 15 | 29,700       | 29,938 | 29,839 | 29,826   | 25,100       | 25,351 | 25,315 | 25,256   |
| 1     | 16 | 30,566       | 30,984 | 30,767 | 30,772   | 24,926       | 25,392 | 25,153 | 25,157   |
| 1     | 17 | 30,757       | 30,894 | 30,988 | 30,880   | 25,630       | 25,842 | 25,974 | 25,815   |
| 1     | 18 | 34,474       | 34,548 | 34,194 | 34,405   | 28,174       | 28,476 | 28,435 | 28,362   |
| 2     | 1  | 31,236       | 30,987 | 31,207 | 31,143   | 25,965       | 25,863 | 25,685 | 25,838   |
| 2     | 2  | 30,642       | 30,813 | 30,807 | 30,754   | 25,371       | 25,393 | 25,348 | 25,371   |
| 2     | 3  | 29,684       | 29,911 | 29,741 | 29,779   | 24,404       | 24,687 | 24,420 | 24,504   |
| 2     | 4  | 34,855       | 34,903 | 35,656 | 35,138   | 29,815       | 29,959 | 29,871 | 29,882   |
| 2     | 5  | 30,500       | 30,781 | 30,565 | 30,615   | 25,865       | 26,094 | 25,643 | 25,867   |
| 2     | 6  | 33,208       | 33,214 | 32,956 | 33,126   | 28,242       | 28,378 | 28,268 | 28,296   |
| 2     | 7  | 30,444       | 30,644 | 30,583 | 30,557   | 24,507       | 24,675 | 24,444 | 24,542   |
| 2     | 8  | 30,671       | 31,039 | 30,841 | 30,850   | 24,718       | 24,961 | 24,920 | 24,866   |
| 2     | 9  | 34,300       | 34,578 | 34,536 | 34,471   | 27,922       | 28,080 | 28,121 | 28,041   |
| 2     | 10 | 32,318       | 32,624 | 32,511 | 32,484   | 27,633       | 28,013 | 27,857 | 27,834   |

Grupo 1 = Controle, Grupo 2 = Endometriose

**Gene alvo: SMAD3 (continuação)**Cálculos de expressão gênica relativa para *SMAD3* - método  $\Delta\Delta Ct$ .

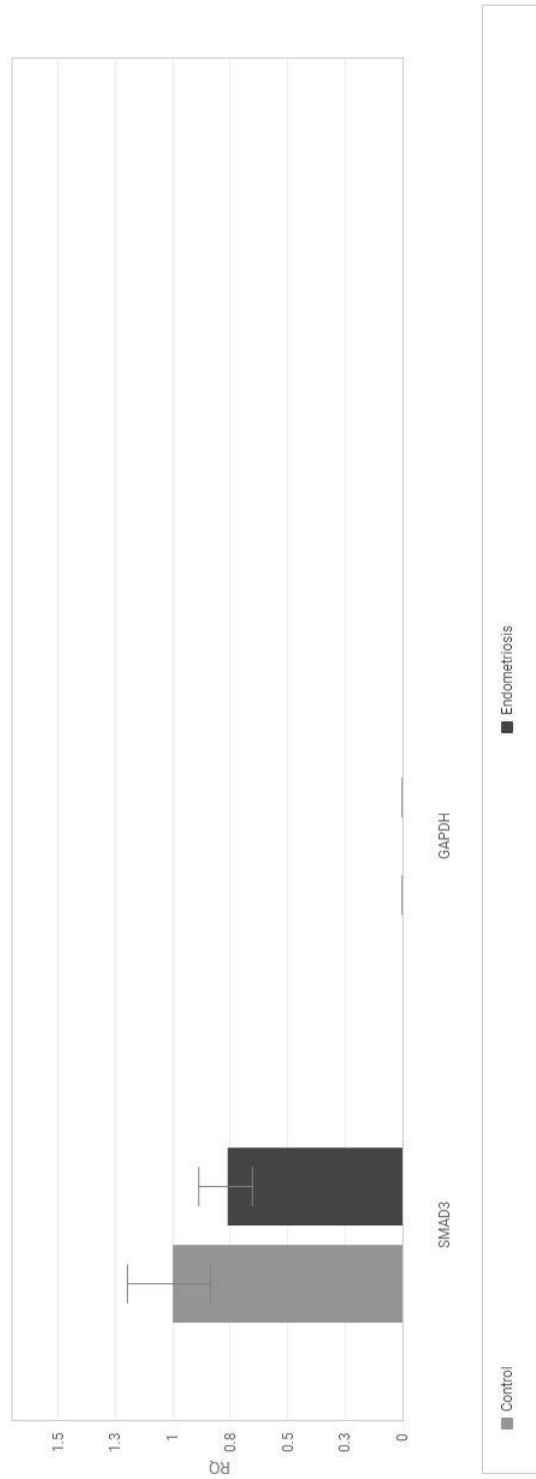
| Grupo        | <i>SMAD3</i> | <i>GAPDH</i> | $\Delta Ct$ | $\Delta\Delta Ct$ | Quantidade normalizada de <i>SMAD3</i><br>em relação ao Controle $2^{\wedge-\Delta\Delta Ct}$ |
|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------------|---|
| Controle     | 35.276       | 29.339       | 5.936       |                   |   |
|              | 31.594       | 27.493       | 4.100       |                   |   |
|              | 32.478       | 27.377       | 5.101       |                   |   |
|              | 35.433       | 30.046       | 5.387       |                   |   |
|              | 34.436       | 28.557       | 5.879       |                   |   |
|              | 32.365       | 27.822       | 4.543       |                   |   |
|              | 30.601       | 25.786       | 4.815       |                   |   |
|              | 32.614       | 30.041       | 2.573       |                   |   |
|              | 34.124       | 30.844       | 3.281       |                   |   |
|              | 34.961       | 28.571       | 6.390       |                   |   |
|              | 33.866       | 28.669       | 5.197       |                   |   |
|              | 31.844       | 26.725       | 5.119       |                   |   |
|              | 33.179       | 28.297       | 4.882       |                   |   |
|              | 34.278       | 28.878       | 5.400       |                   |   |
|              | 29.826       | 25.256       | 4.570       |                   |   |
|              | 30.772       | 25.157       | 5.615       |                   |   |
| 30.880       | 25.815       | 5.065        |             |                   |   |
| 34.405       | 28.362       | 6.043        |             |                   |   |
| Média        |              |              | 4,99±0,95   | 0,00              | 1,00  |
| Endometriose | 31.143       | 25.838       | 5.305       |                   |   |
|              | 30.754       | 25.371       | 5.384       |                   |   |
|              | 29.779       | 24.504       | 5.275       |                   |   |
|              | 35.138       | 29.882       | 5.257       |                   |   |
|              | 30.615       | 25.867       | 4.748       |                   |   |
|              | 33.126       | 28.296       | 4.830       |                   |   |
|              | 30.557       | 24.542       | 6.015       |                   |   |
|              | 30.850       | 24.866       | 5.984       |                   |   |
|              | 34.471       | 28.041       | 6.430       |                   |   |
| 32.484       | 27.834       | 4.650        |             |                   |   |
| Média        |              |              | 5,39±0,59   | 0,40              | 0,758   |

 $\Delta Ct = Ct$  médio *SMAD3* -  $Ct$  médio *GAPDH* (média  $\pm$  desvio-padrão) $\Delta\Delta Ct =$  média  $\Delta Ct$  - média  $\Delta Ct$  Controle

**Gene alvo: SMAD3 (continuação)**

Relative Quantification App - Thermo Fisher

| Target | Biological Group | $\Delta$ CT Mean | $\Delta$ CT SE | F-Factor | $\Delta$ CT | $\Delta$ CT - F <sub>0</sub> | $\Delta$ CT + F <sub>0</sub> | RQ    | RQ Min | RQ Max | Corrected P-Value |
|--------|------------------|------------------|----------------|----------|-------------|------------------------------|------------------------------|-------|--------|--------|-------------------|
| SMAD3  | Control          | 4.994            | 0.130          | 2.006    | 0.000       | -0.260                       | 0.260                        | 1.000 | 0.835  | 1.198  | 1.000             |
| SMAD3  | Endometriosis    | 5.388            | 0.108          | 2.045    | 0.394       | 0.174                        | 0.614                        | 0.761 | 0.654  | 0.887  | 0.381             |
| GAPDH  | Control          | -                | -              | -        | -           | -                            | -                            | -     | -      | -      | -                 |
| GAPDH  | Endometriosis    | -                | -              | -        | -           | -                            | -                            | -     | -      | -      | -                 |



## Anexo 16

Gene alvo: *SMAD4*Dados de expressão gênica de *SMAD4* e *GAPDH* para os grupos em estudo.

| Grupo | n  | <i>SMAD4</i> |        |        |          | <i>GAPDH</i> |        |        |          |
|-------|----|--------------|--------|--------|----------|--------------|--------|--------|----------|
|       |    | Ct1          | Ct2    | Ct3    | Ct médio | Ct1          | Ct2    | Ct3    | Ct médio |
| 1     | 1  | 33,843       | 34,600 | 34,871 | 34,438   | 28,864       | 29,300 | 29,407 | 29,190   |
| 1     | 2  | 30,782       | 30,847 | 31,056 | 30,895   | 27,282       | 27,431 | 27,425 | 27,379   |
| 1     | 3  | 31,529       | 31,834 | 31,758 | 31,707   | 27,234       | 27,424 | 27,528 | 27,395   |
| 1     | 4  | 34,693       | 34,510 | 34,838 | 34,680   | 29,955       | 29,990 | 30,246 | 30,064   |
| 1     | 5  | 33,528       | 33,629 | 33,910 | 33,689   | 28,601       | 28,616 | 28,680 | 28,632   |
| 1     | 6  | 31,393       | 31,708 | 31,672 | 31,591   | 27,394       | 27,870 | 27,731 | 27,665   |
| 1     | 7  | 31,157       | 31,436 | 31,327 | 31,307   | 25,726       | 25,771 | 25,732 | 25,743   |
| 1     | 8  | 33,533       | 33,693 | 33,872 | 33,699   | 29,930       | 29,984 | 30,038 | 29,984   |
| 1     | 9  | 33,759       | 34,041 | 34,126 | 33,975   | 30,732       | 31,041 | 30,903 | 30,892   |
| 1     | 10 | 34,461       | 34,291 | 34,688 | 34,480   | 29,020       | 29,021 | 28,967 | 29,003   |
| 1     | 11 | 33,301       | 33,745 | 33,575 | 33,540   | 28,614       | 29,317 | 28,634 | 28,855   |
| 1     | 12 | 31,359       | 31,603 | 31,653 | 31,538   | 26,429       | 26,713 | 26,596 | 26,579   |
| 1     | 13 | 32,430       | 32,576 | 32,553 | 32,520   | 28,178       | 28,342 | 28,287 | 28,269   |
| 1     | 14 | 33,784       | 33,726 | 33,800 | 33,770   | 28,774       | 28,866 | 28,839 | 28,827   |
| 1     | 15 | 30,613       | 30,946 | 30,874 | 30,811   | 24,979       | 25,334 | 25,196 | 25,170   |
| 1     | 16 | 30,431       | 30,530 | 30,660 | 30,540   | 24,905       | 25,170 | 25,292 | 25,122   |
| 1     | 17 | 31,226       | 31,488 | 31,600 | 31,438   | 25,527       | 25,927 | 26,028 | 25,827   |
| 1     | 18 | 33,166       | 33,396 | 33,409 | 33,324   | 27,871       | 28,383 | 28,255 | 28,170   |
| 2     | 1  | 31,493       | 31,593 | 31,578 | 31,555   | 25,716       | 25,789 | 25,673 | 25,726   |
| 2     | 2  | 30,897       | 31,085 | 30,978 | 30,987   | 25,363       | 25,506 | 25,309 | 25,393   |
| 2     | 3  | 30,064       | 30,389 | 30,029 | 30,161   | 24,397       | 24,731 | 24,122 | 24,417   |
| 2     | 4  | 34,753       | 35,021 | 35,060 | 34,945   | 29,699       | 29,868 | 29,816 | 29,794   |
| 2     | 5  | 30,781       | 30,961 | 31,011 | 30,918   | 25,782       | 25,955 | 25,813 | 25,850   |
| 2     | 6  | 32,492       | 32,598 | 32,358 | 32,483   | 28,085       | 28,201 | 28,043 | 28,110   |
| 2     | 7  | 30,781       | 30,902 | 30,740 | 30,807   | 24,452       | 24,552 | 24,413 | 24,472   |
| 2     | 8  | 30,869       | 31,222 | 31,053 | 31,048   | 24,716       | 24,955 | 24,786 | 24,819   |
| 2     | 9  | 33,181       | 32,922 | 33,152 | 33,085   | 27,777       | 27,869 | 27,937 | 27,861   |
| 2     | 10 | 32,375       | 32,940 | 33,063 | 32,793   | 27,887       | 28,316 | 28,422 | 28,208   |

Grupo 1 = Controle, Grupo 2 = Endometriose

**Gene alvo: SMAD4 (continuação)**Cálculos de expressão gênica relativa para *SMAD4* - método  $\Delta\Delta Ct$ .

| Grupo        | <i>SMAD4</i> | <i>GAPDH</i> | $\Delta Ct$ | $\Delta\Delta Ct$ | Quantidade normalizada de <i>SMAD4</i><br>em relação ao Controle $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------------|---|
| Controle     | 34.438       | 29.190       | 5.248       |                   |   |
|              | 30.895       | 27.379       | 3.516       |                   |   |
|              | 31.707       | 27.395       | 4.312       |                   |   |
|              | 34.680       | 30.064       | 4.617       |                   |   |
|              | 33.689       | 28.632       | 5.057       |                   |   |
|              | 31.591       | 27.665       | 3.926       |                   |   |
|              | 31.307       | 25.743       | 5.564       |                   |   |
|              | 33.699       | 29.984       | 3.715       |                   |   |
|              | 33.975       | 30.892       | 3.084       |                   |   |
|              | 34.480       | 29.003       | 5.478       |                   |   |
|              | 33.540       | 28.855       | 4.685       |                   |   |
|              | 31.538       | 26.579       | 4.959       |                   |   |
|              | 32.520       | 28.269       | 4.251       |                   |   |
|              | 33.770       | 28.827       | 4.944       |                   |   |
|              | 30.811       | 25.170       | 5.642       |                   |   |
|              | 30.540       | 25.122       | 5.418       |                   |   |
| 31.438       | 25.827       | 5.611        |             |                   |   |
| 33.324       | 28.170       | 5.154        |             |                   |   |
| Média        |              |              | 4,73±0,78   | 0,00              | 1,00  |
| Endometriose | 31.555       | 25.726       | 5.829       |                   |   |
|              | 30.987       | 25.393       | 5.594       |                   |   |
|              | 30.161       | 24.417       | 5.744       |                   |   |
|              | 34.945       | 29.794       | 5.150       |                   |   |
|              | 30.918       | 25.850       | 5.068       |                   |   |
|              | 32.483       | 28.110       | 4.373       |                   |   |
|              | 30.807       | 24.472       | 6.335       |                   |   |
|              | 31.048       | 24.819       | 6.229       |                   |   |
|              | 33.085       | 27.861       | 5.224       |                   |   |
| 32.793       | 28.208       | 4.585        |             |                   |   |
| Média        |              |              | 5,41±0,65   | 0,68              | 0,624   |

 $\Delta Ct = Ct$  médio *SMAD4* -  $Ct$  médio *GAPDH* (média  $\pm$  desvio-padrão) $\Delta\Delta Ct =$  média  $\Delta Ct$  - média  $\Delta Ct$  Controle

**Gene alvo: SMAD4 (continuação)**

Relative Quantification App - Thermo Fisher

| Target | Biological Group | $\Delta$ CT Mean | $\Delta$ CT SE | F-Factor | $\Delta$ CT | $\Delta$ CT - F <sub>0</sub> | $\Delta$ CT + F <sub>0</sub> | RQ    | RQ Min | RQ Max | Corrected P-Value |
|--------|------------------|------------------|----------------|----------|-------------|------------------------------|------------------------------|-------|--------|--------|-------------------|
| SMAD4  | Control          | 4.732            | 0.105          | 2.006    | 0.000       | -0.210                       | 0.210                        | 1.000 | 0.864  | 1.157  | 1.000             |
| SMAD4  | Endometriosis    | 5.413            | 0.116          | 2.045    | 0.681       | 0.444                        | 0.918                        | 0.624 | 0.529  | 0.735  | 0.044             |
| GAPDH  | Endometriosis    | -                | -              | -        | -           | -                            | -                            | -     | -      | -      | -                 |
| GAPDH  | Control          | -                | -              | -        | -           | -                            | -                            | -     | -      | -      | -                 |

