

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**EFEITOS DA ANGIOTENSINA II NA REGULAÇÃO DO SISTEMA
PLASMINOGÊNIO-PLASMINA EM CÉLULAS ENDOMETRIAIS ESTROMAIS
HUMANAS: POSSÍVEL PAPEL NA PATOGENIA DA ENDOMETRIOSE**

Pamela Zanon

Porto Alegre, 2022

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**EFEITOS DA ANGIOTENSINA II NA REGULAÇÃO DO SISTEMA
PLASMINOGÊNIO-PLASMINA EM CÉLULAS ENDOMETRIAIS ESTROMAIS
HUMANAS: POSSÍVEL PAPEL NA PATOGENIA DA ENDOMETRIOSE**

Pamela Zanon

Orientador: Prof. Dr. Markus Berger

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2022

CIP - Catalogação na Publicação

Zanon, Pamela
EFEITOS DA ANGIOTENSINA II NA REGULAÇÃO DO SISTEMA
PLASMINOGÊNIO-PLASMINA EM CÉLULAS ENDOMETRIAIS
ESTROMAIS HUMANAS: POSSÍVEL PAPEL NA PATOGENIA DA
ENDOMETRIOSE / Pamela Zanon. -- 2022.
117 f.
Orientador: Markus Berger.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Célula endometrial. 2. angiotensina. 3.
endometriose. 4. plasmina. 5. plasminogênio. I.
Berger, Markus, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Para realização deste trabalho algumas pessoas me ajudaram e sem as quais não teria sido fácil segui-lo. A todas elas, as quais seria exaustivo aqui anunciar, a minha profunda gratidão. Algumas delas pelo apoio especial que me prestaram ao longo deste trabalho gostaria de agradecer em especial:

Meu orientador, Prof. Dr. Markus Berger, por toda a paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientou neste trabalho e em todos aqueles que realizei durante minha graduação, acreditando na conclusão de mais este ciclo, serei sempre grata. Muito obrigada por me ter corrigido quando necessário sem nunca me desmotivar.

À Profa. Dra. Paula Barros Terraciano que me acompanhou durante todo esse período, obrigada pelos ensinamentos muito além da área acadêmica, pela motivação, por estar sempre pronta a ajudar e com um sorriso no rosto. Obrigada por ter me acolhido no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular CPE-HCPA, este trabalho não seria possível sem esta parceria. Agradeço às equipes do Laboratório de Bioquímica Farmacológica CPE-HCPA e colegas envolvidos na execução dos experimentos e do artigo pelo trabalho em conjunto, tornando possível que fosse feito tanto.

Agradeço aos meus pais, meu maior orgulho, aqueles que me apoiam independente do caminho escolhido e seguem do meu lado. Agradeço também aos meus irmãos, meu maior exemplo de dedicação e determinação. Agradeço meu companheiro Tiago que me motivou a chegar onde estou hoje, me acompanhou durante momentos muito difíceis, sempre tornando-os mais leves e esquecíveis, porque sempre me entregou um amor incondicional, tudo isso é principalmente graças a você e a sua família, que me acolheu em Porto Alegre com tanto carinho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS.....	9
RESUMO	10
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO.....	14
REVISÃO DA LITERATURA	16
1 Estratégias para localizar e selecionar as informações	16
2 Referencial Teórico	18
2.1 Epidemiologia da Endometriose e seu diagnóstico	18
2.2 Fisiopatologia da endometriose	21
2.3 Tratamento.....	22
2.4 Sistema Renina-angiotensina (SRA)	23
2.5 Influência do SRA sobre o tecido reprodutivo	28
2.6 Sistema Plasminogênio-Plasmina (PPS)	29
2.7 Influência do PPS sobre o tecido endometrial.....	32
3. Mapa conceitual.....	34

JUSTIFICATIVA	36
HIPÓTESES	37
1. Hipótese Nula	37
2. Hipótese Alternativa	37
OBJETIVOS	38
1. Principal.....	38
2. Secundários.....	38
REFERÊNCIAS	39
ARTIGO EM INGLÊS	51
CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
ANEXOS	97
1. Documento de aprovação de pesquisa no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.....	97
2. Justificativa para a dispensa de TCLE.....	99
3. Curriculum Vitae.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS

AGT	Angiotensinogênio (do inglês, <i>Angiotensinogen</i>)
Ang I	Angiotensina I (do inglês, <i>Angiotensin I</i>)
Ang II	Angiotensina II (do inglês, <i>Angiotensin II</i>)
APA	Aminopectidase ácida (do inglês, <i>acid aminopeptidase</i>)
APB	Aminopectidase básica (do inglês, <i>basic aminopeptidase</i>)
APM	Aminopectidase neutra insensível à puromicina (do inglês, <i>Puromycin-insensitive neutral aminopeptidase</i>)
APN	Aminopectidase neutra (do inglês, <i>neutral aminopeptidase</i>)
AT1R	Receptor tipo 1 de angiotensina II (do inglês, <i>Angiotensin II type 1 Receptor</i>)
CAP	<i>Cystinyl aminopeptidase</i>
CATG	<i>Cathepsin G</i>
CCA	Centro Cirúrgico Ambulatorial
CHY	<i>Chymase</i>
CPE	Centro de Pesquisa Experimental
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxide</i>
DNPH	<i>2,4-dinitrophenylhydrazine</i>

DPPIV	<i>Dipeptidyl peptidase IV</i>
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês, <i>Epidermal Growth Factor</i>)
ERK	Proteínas quinases de regulação intracelular (do inglês, <i>Extracellular signal-regulated protein kinases</i>)
ESCs	Células estromais endometriais (do inglês, <i>Endometrial stromal cells</i>)
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos (do inglês, <i>Fibroblast growth factors</i>)
FGFR	Receptor do fator de crescimento de fibroblastos (do inglês, <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>)
FSH	Hormônio folículo-estimulante (do inglês, <i>Follicle-stimulating hormone</i>)
GLU-AP	<i>Glutamyl aminopeptidase</i>
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina (do inglês, <i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>)
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
hESCs	Células estromais endometriais humanas (do inglês, <i>human Endometrial Stromal Cells</i>)
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor-1</i>

IL-1 β	Interleucina 1 β (do inglês, <i>interleukin beta</i>)
IL6	Interleucina 6 (do inglês, <i>interleukin 6</i>)
LH	Hormônio luteinizante (do inglês, <i>Luteinizing Hormone</i>)
MEC	Matrix extracelular (do inglês, ECM, <i>Extracellular matrix</i>)
MMPs	Metaloproteinase de matriz (do inglês, <i>Matrix metalloproteinases</i>)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide</i>
NBT	<i>Nitroblue Tetrazolium</i>
NEP	Endopeptidase neutra (do inglês, <i>neutral endopeptidase</i>)
NF- κ B	Fator nuclear kappa B (do inglês, <i>Nuclear Factor kappa B</i>)
NOX	<i>NADPH oxidase</i>
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio codificado pela SERPINA 1 (do inglês, <i>Plasminogen activator inhibitor -1</i>)
PAI-2	Inibidor do ativador de plasminogênio codificado pela SERPINA 2 (do inglês, <i>Plasminogen activator inhibitor -2</i>)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PLG	ativadores de plasminogênio (do inglês, <i>Plasminogen</i>)
PLGBP	Proteína ligante de PLG (do inglês, <i>plasminogen binding protein</i>)

PP2 e PP2A	Subunidades catalíticas de proteínas fosfatase do adenovírus (do inglês <i>Protein phosphatase 2</i> e <i>Protein phosphatase 2A</i>)
PPS	Sistema plasminogênio-plasmina (do inglês, <i>Plasminogen-plasmin system</i>)
pró-uPA	zimogênio do uPA
PTX	Toxina pertussis (do inglês <i>pertussis toxin</i>)
RGS	Proteínas codificadas por adenovírus (subunidades RGS-LSC e RGS4)
RhoA	Proteína transformadora RhoA (do inglês, <i>Ras homolog family member A</i>)
ROCK	Proteína-quinase associada a Rho (do inglês, <i>Rho-associated protein kinase</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate in polyrylamide gel electrophoresis</i>
SE	<i>Standard error</i>
SHR	Ratas espontaneamente hipertensas (do inglês, <i>Spontaneously hypertensive rat</i>)
SRA	Sistema Renina-Angiotensinas
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	<i>Transformation Growth Factor beta</i> (Fator de transformação do crescimento beta)
TKLK	<i>Chromogenic substrates for tissue kallikrein</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, <i>Tumor necrosis factor alpha</i>)

tPA	Ativador de plasminogênio tipo-tecidual (do inglês, <i>tissue-type plasminogen activator</i>)
uPA	Ativador de plasminogênio tipo-uroquinase (do inglês, <i>urokinase-like plasminogen activator</i>)
uPAR	Receptor de ativador de plasminogênio tipo-uroquinase (do inglês, <i>urokinase-like plasminogen activator receptor</i>)
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VEGFR1	Receptor Flt-1 de VEGF (do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1</i>)
VEGFR2	Receptores KDR de VEGF (do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1</i>)
WKY	Wistar Kyoto

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Visão clássica do sistema renina-angiotensina e caliceína-cininas modificado de Nehme <i>et al.</i> , 2019.....	25
FIGURA 2. Vias alternativas de geração de Ang II em células da musculatura lisa vascular e cardiomiócitos em condições de hiperglicemia modificado de Nehme <i>et al.</i> , 2019	26
FIGURA 3. Angiogênese induzida por VEGF e Ang II via RHOA-ROCK	27
FIGURA 4. Função e regulação do sistema plasminogênio-plasmina (PPS).....	32
FIGURA 5. Mapa conceitual	34
FIGURA 6. Mecanismos envolvidos na modulação do sistema plasminogênio-plasmina (pps) pela angiotensina II (Ang II) nas células estromais endometriais humanas (hESCs)	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas	17
TABELA 2. Artigos selecionados nas bases de dados PubMed, SciELO e periódicos da capes.	18

RESUMO

Introdução. A endometriose é caracterizada pela presença de tecido estromal endometrial fora da cavidade uterina. As células do estroma endometrial humano (hESCs) têm um papel essencial na endometriose, uma vez que essas células podem adquirir um perfil pró-invasivo e pró-inflamatório migrando para regiões extrauterinas. **Objetivo.** Neste trabalho investigamos a capacidade da angiotensina II (Ang II) de modular o sistema plasminogênio-plasmina em hESCs e contribuir para a proliferação celular, degradação da matriz extracelular e inflamação. **Métodos.** Os mecanismos reguladores do sistema plasminogênio-plasmina e suas consequências na proliferação celular, sinalização inflamatória e oxidativa foram investigados utilizando hESCs primárias obtidas de pacientes e estimuladas com Ang II *in vitro*. **Resultados.** Endopeptidases e aminopeptidases envolvidas no metabolismo da Ang II, bem como a expressão de angiotensinogênio, quimase e do receptor AT1 (AT1R) de Ang II aumentaram significativamente em hESCs após o tratamento com Ang II. De forma similar, as enzimas metabolizadoras de Ang II também foram reguladas positivamente em extratos de útero de ratas espontaneamente hipertensas. Em hESCs, ativadores de plasminogênio tipo tecidual (tPA) e uroquinase (uPA) e o receptor para uPA (uPAR) foram induzidos na presença de Ang II. Esses eventos foram associados a um aumento na geração de plasmina tanto na superfície de hESC quanto no meio acondicionado. Conseqüentemente, a geração de plasmina induzida por Ang II potencializou a degradação da fibrina e das proteínas de matriz extracelular. Foi também observado um aumento na viabilidade e proliferação das células estimuladas com Ang II, o que se relacionou com um aumento na expressão proteica de fatores de crescimento (EGF e FGF/FGFR) e angiogênese (VEGF). A Ang II modulou a sinalização oxidativa e inflamatória em hESCs, principalmente através da NADPH oxidase e aumento de citocinas como TNF α , IL1 β , IL6 e moléculas de adesão envolvidas no rolamento e migração de leucócitos. De forma

interessante, o bloqueio do AT1R com losartana diminuiu a geração de plasmina induzida por Ang II e o potencial pró-invasivo das hESCs. **Conclusão.** Ativadores de plasminogênio aumentaram em hESCs após tratamento com Ang II gerando plasmina ativa e desencadeando vias proliferativas, inflamatórias e pró-oxidativas. O mecanismo foi AT1R dependente e relacionado à degradação da matriz extracelular contribuindo para o perfil invasivo de hESC comumente descrito na endometriose.

Palavras-chave: Célula endometrial; angiotensina; endometriose; plasmina; plasminogênio; inflamação.

ABSTRACT

Introduction. Endometriosis is characterized by the presence of endometrial stromal tissue outside the uterine cavity. Human endometrial stromal cells (hESCs) have an essential role in endometriosis since these cells can acquire a pro-invasive and proinflammatory profile by migrating to extrauterine regions. **Aim.** Here we investigated the ability of angiotensin II (Ang II) to modulate the plasminogen-plasmin system in hESCs and contribute to cell proliferation, matrix degradation and inflammation. **Methods.** Plasminogen-plasmin regulatory mechanisms and its consequence to cell proliferation, inflammatory and oxidative signaling were studied using primary hESCs obtained from donor patients and stimulated with Ang II *in vitro*. **Results.** Endopeptidase and aminopeptidases involved in angiotensin metabolism as well as the expression of angiotensinogen, chymase and AT1 receptor (AT1R) increased significantly in hESCs after Ang II treatment. Accordingly, angiotensin metabolizing enzymes were also up-regulated in uterine extracts from spontaneously hypertensive rats. In hESCs, tissue (tPA)- and urokinase (uPA)- type plasminogen activators and the receptor for uPA (uPAR) were induced in the presence of Ang II. These events were associated with an increased plasmin generation both in hESC surface and conditioned media. Consequently, Ang II-induced plasmin generation enhanced fibrin and matrix protein degradation and also increased hESC viability and proliferation by up-regulating growth factor expression (EGF and FGF/FGFR) and angiogenesis regulation (VEGF). Ang II modulates oxidative and inflammatory signaling in hESCs, mainly through NADPH oxidase and by increasing cytokines such as TNF α , IL1 β , IL6 and adhesion molecules involved in leukocyte rolling and migration. Interestingly, blocking AT1R with losartan, decreased Ang II-induced plasmin generation and the hESC pro-invasive potential. **Conclusion.** Plasminogen activators increased in hESCs upon Ang II treatment generating active plasmin and triggering proliferative, inflammatory and pro-oxidative

pathways. The mechanism was AT1R dependent and related to extracellular matrix degradation contributing to hESC invasive profile commonly described in endometriosis.

Keywords: Endometrial cell; angiotensin; endometriosis; plasmin; plasminogen; inflammation.

INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença crônica, inflamatória e estrogênio-dependente, onde o tecido endometrial em localização ectópica pode causar lesão, sangramento e dor nas mulheres acometidas (1, 2). Apesar dos esforços científicos, a patogênese da endometriose ainda não é clara, sendo a teoria da menstruação retrógrada a mais aceita (3, 4). Os métodos diagnósticos não-invasivos por imagem são os mais comumente utilizados, uma vez que não existem biomarcadores validados até o momento (3). Assim, a endometriose constitui um problema de saúde pública, pelo aumento da demanda por recursos nacionais em saúde e afastamento laborativo de inúmeras mulheres jovens em seu período mais produtivo (5). As opções de tratamento são limitadas ao controle hormonal e técnica cirúrgica, mas altas taxas de recorrência da doença ainda continuam sendo documentadas (3, 6).

Mais recentemente alguns trabalhos na literatura vem sugerindo a importância do Sistema Renina-Angiotensinas (SRA) na sinalização molecular da endometriose (7, 8). Como o receptor de angiotensina II tipo 1 (em inglês *Angiotensin II type 1 Receptor*, AT1R) está amplamente expresso nos tecidos reprodutivos, incluindo as células estromais endometriais e células da granulosa e cumulus nos ovários (9), alguns trabalhos demonstraram que o bloqueio desse receptor reduz o crescimento de lesões endometrióticas em camundongos e inibe a vascularização que alimenta as células estromais endometriais na lesão (7). Apesar dos dados atuais, que sugerem envolvimento do SRA na endometriose, os mecanismos pelos quais a Ang II pode contribuir, principalmente para alteração do perfil invasivo das células estromais endometriais, ainda não são conhecidos.

Neste trabalho levantamos a hipótese de que a Ang II poderia regular os sistemas de degradação de matriz extracelular (MEC), como o sistema plasminogênio-plasmina (em inglês

Plasminogen-plasmin system, PPS), o que tornaria essas células estromais endometriais mais propensas a proliferar, migrar e invadir os tecidos. Para a investigação desses diferentes mecanismos propomos a utilização de modelos experimentais *in vitro* em cultura primária de células estromais endometriais humanas (em inglês *human Endometrial Stromal Cells*, hESCs) obtidas a partir de biópsias de endométrio de pacientes que foram atendidas no setor de Reprodução Assistida do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

REVISÃO DA LITERATURA

1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Inicialmente a pesquisa foi realizada no PubMed utilizando-se as seguintes palavras-chave: “*Endometrial cell*”, “*angiotensin*”, “*endometriosis*”, “*plasmin*”, “*plasminogen*” e “*inflammation*” sem limite de tempo de publicação. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: *PubMed* e *SciELO*. Também foi consultado o banco de periódicos da CAPES, cujos termos foram traduzidos para o português: Célula endometrial, angiotensina, endometriose, plasmina, plasminogênio e inflamação.

Em relação ao termo “*endometriosis*” foram encontrados 31.901 artigos no PUBMED, 407 no SciELO e 1.178 no banco de periódicos da CAPES. Usando o termo “*endometrial cells*” foram localizados 21.935 artigos no PUBMED, 63 no SciELO e 52 no banco de periódicos da CAPES.

Cruzando a palavras-chaves “*endometriosis*”, “*endometrial cells*” e “*inflammation*” vemos uma redução significativa no número de artigos publicados nos três bancos de dados. Ao direcionar nossa busca com o cruzamento das palavras-chaves “*endometriosis*”, “*inflammation*” com “*angiotensin*”, “*plasmin*” e “*plasminogen*” observamos uma carência em trabalhos publicados, como é possível observar na Tabela 1, que sumariza a estratégia de buscas das referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos do estudo.

Tabela 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas.

PALAVRA-CHAVE	PUBMED	SCIELO	CAPES
endometriosis	31.901	407	1.178
endometrial cells	21.935	63	52
endometriosis AND angiotensin	25	1	2
endometriosis AND plasmin	11	0	0
endometriosis AND plasminogen	94	1	1
endometriosis AND angiotensin AND plasminogen	2	1	1
endometrial cells AND angiotensin AND plasminogen	3	1	1
endometriosis AND inflammation	1.488	0	4
endometrial cells AND inflammation	1.075	0	4
endometriosis AND inflammation AND angiotensin	1	0	0
endometriosis AND inflammation AND plasminogen	12	0	0
endometriosis AND inflammation AND plasmin	1	0	0
endometriosis AND inflammation AND angiotensin AND plasminogen	0	0	0
endometriosis AND inflammation AND angiotensin AND plasmin	0	0	0

Depois de concluída a busca, os artigos foram selecionados primeiramente a partir de uma leitura prévia dos resumos, excluindo-se os que não condizem com o tema deste trabalho (Tabela 2). Para os artigos restantes, priorizaram-se aqueles publicados nos últimos 20 anos e foi realizada uma leitura mais detalhada dos trabalhos. Ao final, foram utilizadas 93 referências, dentre artigos (86), livros (2) e teses (5).

Tabela 2. Artigos selecionados nas bases de dados PubMed, SciELO e periódicos da CAPES.

	PUBMED	SCIELO	CAPES
Número total de artigos	56.548	474	1.243
Número de artigos selecionados	83	23	57

2 Referencial Teórico

2.1 Epidemiologia da Endometriose e seu diagnóstico

A endometriose caracteriza-se pela presença de tecido endometrial, glândula e/ou estroma, em localização ectópica. Deste modo, estima-se que a endometriose acometa de 5 a 15 % da população feminina em idade reprodutiva e 2 a 5% das mulheres após a menopausa (10-12). De uma maneira geral os sintomas impactam severamente a qualidade de vida da mulher, entre eles, destacam-se a dismenorreia, muitas vezes incapacitante, que ocorre em 62,2 % das afetadas. Os sintomas algícos podem causar desconforto por anos e acometem cerca de 70 % das mulheres com endometriose, justificando os constantes atendimentos de emergência e a alta taxa de absentismo profissional (13, 14). Foi observado também a prevalência da endometriose em mulheres inférteis, cerca de 5-50 % em comparação com mulheres assintomáticas e sintomáticas submetidas a laparoscopia ou tratamento empírico (15).

Os endometriomas ectópicos têm um status benigno, embora algumas características sejam comuns aos processos relacionados ao câncer, incluindo o mecanismo de angiogênese. (16). Entre 1925 e 1953, foram propostos os primeiros critérios para correlacionar a endometriose ovariana com o risco de câncer. Para tanto seria necessário a presença de tecido endometrial benigno e maligno no mesmo ovário, originado da endometriose e não de outro local, achados de tecido semelhante ao estroma endometrial circundando glândulas epiteliais características e ainda, a necessidade de demonstrar a transição entre endometriose benigna e epitélio maligno (17, 18).

A partir desses critérios, uma análise feita sobre casos de endometriose ovariana ou tumor epitelial maligno ovariano no período de 1987 a 1995 evidenciou que, apenas 1,7 % das endometrioses ovarianas apresentavam alterações glandulares atípicas sendo que, destas, 25 % evoluíram para carcinoma endometrióide subsequente (19). Uma série de casos mais recentes, evidenciaram 5 % a 10 % de câncer ovariano em lesões de endometriose do ovário, enquanto que a frequência total de transformação maligna foi estimada entre 0,3 a 2,5 % (20, 21). Por outro lado, 24,1 % dos cânceres de ovário estavam associados à endometriose ovariana e 5,8 % apresentavam endometriose atípica em continuidade com o tumor (22, 23).

O CA-125 é um marcador sérico encontrado em estruturas derivadas do epitélio celômico, sendo um marcador comum à maioria dos carcinomas ovarianos epiteliais, cuja expressão parece estar aumentada na endometriose grave. Apesar de muitas especulações, ainda pouco se sabe sobre os eventos genéticos envolvidos no processo de transformação da endometriose em carcinoma, assim o CA-125 não parece ter alguma relação com o aparecimento da endometriose, sendo útil no seguimento da paciente, pois o aumento do nível sérico sugere recorrência da doença (24).

Com isso, observa-se em estudos epidemiológicos sobre endometriose, que somente a avaliação clínica pode trazer um viés de confusão na identificação dos grupos de controle apropriado, devido aos múltiplos fatores de risco associados à endometriose como a dismenorreia, dispareunia de profundidade, a dor pélvica acíclica, as alterações intestinais e/ou urinárias cíclicas e a infertilidade (25). Esses sinais e sintomas podem muitas vezes, ser uma consequência da doença ao invés de uma causa (15), tornando sua taxa de incidência imprecisa, pela dificuldade em definir o momento exato do seu início. Além disso, o diagnóstico pode levar muitos anos para ser estabelecido, devido à semelhança clínica com outras patologias, desta forma imagens não invasivas são os métodos diagnósticos padrão, uma vez que não existem biomarcadores validados até o momento, o que faz com que a prevalência da doença não seja exatamente conhecida (3, 26).

Estudos sobre tempo de diagnóstico da endometriose entre 1979 e 1984 estimaram uma média de 9,2 anos, sendo que em 1990 e 1995 esse tempo foi reduzido significativamente para cerca de 4,6 anos (27). Esse achado se deve ao aumento da taxa de escolaridade e ao conhecimento dos sinais e sintomas indicativos de endometriose pela população, influenciando muitas mulheres na busca por atendimento médico. Um estudo brasileiro de 2012, registrou uma média de tempo de 3,4 anos entre início de sintomas e confirmação histopatológica, apontando que nas últimas décadas ainda existe um atraso importante para o diagnóstico da endometriose no Brasil, devido à demora de pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS) serem encaminhados aos cuidados de hospitais-escola com atendimento terciário (28).

Portanto essa doença chama a atenção para os gastos em saúde pública que se tornam cada vez mais altos, devido aos custos de exames clínicos como ultrassonografia transvaginal ou transretal, ressonância magnética (29-31) e internações hospitalares, que totalizaram 59.946 mulheres internadas no Brasil nos períodos entre janeiro de 2015 a dezembro de 2019, onde a

maioria ocorreu na região Sudeste (25.618 casos). Além disso, para as mulheres em idade reprodutiva que desejam engravidar, a infertilidade acaba sendo o sintoma mais importante, tornando a demora para o diagnóstico muito prejudicial (32).

2.2 Fisiopatologia da endometriose

A endometriose é uma doença crônica, inflamatória e estrógeno-dependente. Onde tecido endometrial é achado fora da cavidade uterina, principalmente no peritônio pélvico e ovários, mas pode acometer outros sítios, como a região retrocervical, o sigmóide, o reto, os ureteres, a bexiga, o íleo, o apêndice e raramente a pleura e o pericárdio (3).

A etiologia da endometriose é incerta e por isso muitas são as teorias postuladas (33-35). A menstruação retrógrada é a mais antiga e conhecida. O fluxo menstrual retrógrado é um fenômeno fisiológico, mas em alguns casos, a pressão originada das contrações uterinas pode conduzir ESCs viáveis através das trompas de Falópio. Isso poderia explicar células endometriais ou mesmo fragmentos de endométrio advindos da cavidade uterina através das tubas. No entanto, foi observado que a menstruação retrógrada não ocorre na maioria das pacientes com endometriose e que, o derramamento de sangue menstrual na cavidade peritoneal não contribui para a ocorrência de dismenorreia (36, 37). Estudos sobre 'endometriose microscópica' que refere-se à endometriose presente nas superfícies pélvicas, evidenciam também, que não existe proliferação secundária e formação de implantes na superfície peritoneal pelo endométrio refluído (38).

Outra possível explicação seriam as células do epitélio celomático de origem embrionária, que poderiam sofrer metaplasia por estímulos ambientais ou hormonais transformando-se em células glandulares e estromais endometriais (39, 40). Apesar dessas duas teorias serem as mais divulgadas, várias outras foram descritas tais como, a da disseminação

linfática e hematogênica, a embriológica, a genética, e imunológica e de fatores ambientais (41-45). Entretanto, nenhuma explica a totalidade das possíveis manifestações da doença.

Uma vez que as ESCs atingem a cavidade peritoneal, é necessário que elas se tornem capazes de proliferar fora de seu microambiente normal (5). Isso significa que devem haver sinais moleculares capazes de alterar o perfil dessas células estromais endometriais tornando-as capazes de invadir, migrar e proliferar em outros nichos como a região pélvica, peritônio e ovários (36, 38, 46). Desta forma, tem-se discutido o papel de alguns sistemas enzimáticos como SRA e PPS na sinalização molecular da endometriose (9, 47).

2.3 Tratamento

O tratamento da endometriose tem como objetivo o manejo dos sintomas clínicos, com foco maior no controle da dor e infertilidade. Embora, até hoje, os métodos utilizados venham mostrando uma alta taxa de recorrência da doença, eles ainda são baseados na utilização de fármacos para controle hormonal ou técnica cirúrgica com objetivo de limitar os focos de endometriose (6, 48).

A primeira opção cirúrgica é a videolaparoscópica, pelo menor custo, pela menor morbidade e pela menor formação de aderências, mas essa alternativa, têm um efeito positivo não uniforme e deve ser o menos radical possível para preservação da fertilidade em mulheres que pretendem gestar (6, 49). O tratamento farmacológico é direcionado à supressão estrogênica visando um efeito de hipotrofia endometrial e amenorreia, reduzindo a dor causada pelo crescimento das lesões endometriais e interrompendo ciclos de sangramento. Comumente são utilizados androgênios, progestogênios, e, principalmente, os agonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (em inglês *Gonadotropin-Releasing Hormone*, GnRH) e os contraceptivos

hormonais. As opções de fármacos vão diferir em seu mecanismo de ação, via de administração, duração da terapia e seus efeitos (50).

O uso de contraceptivo hormonal oral é a forma mais comum de tratamento farmacológico, requer uma administração contínua e por tempo prolongado entre 6-12 meses (51). Em um estudo realizado por Taylor *et al.*, (2017) os agonistas do GnRH mostraram eficácia na melhora da dismenorréia e da dor pélvica não menstrual durante um período de 6 meses (52). Os agonistas do GnRH controlam a produção ovariana de estrogênio, através da superestimulação da hipófise (efeito *flare up*) e liberação de hormônio folículo-estimulante (em inglês *Follicle-stimulating hormone*, FSH) e hormônio luteinizante (em inglês *Luteinizing Hormone*, LH). A grande desvantagem dos agonistas do GnRH está na dessensibilização das células gonadotróficas e redução no número de receptores. Como consequência, a paciente pode apresentar sinais e sintomas de uma pseudomenopausa, o que acaba diminuindo a aderência do tratamento a longo prazo. Por outro lado, o uso de progestogênios tem menos efeitos colaterais e menor custo, mas ainda assim constituem tratamentos de longa duração e impedem que essas mulheres possam engravidar (53-55).

2.4 Sistema Renina-angiotensina (SRA)

Juntamente com a noradrenalina, vasopressina e endotelina, a Ang II é um dos mais potentes hormônios pressóricos sistêmicos produzidos no organismo. A Ang II é um peptídeo de 8 aminoácidos (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) gerado no plasma. Na visão mais clássica do SRA, a renina atua diretamente sobre o angiotensinogênio liberando angiotensina I (Ang I) e a enzima conversora de angiotensina (ECA) cliva então a Ang I gerando Ang II. A Ang II formada vai desempenhar um papel importante em vários sistemas vasomotores, na regulação da pressão arterial, do volume do fluido extracelular e no equilíbrio hidroeletrólítico (56, 57).

Em condições fisiológicas normais, o organismo responde a uma redução de pressão arterial, redução de volume de líquido circulante ou redução de sódio, através da liberação de renina pelas células mesangiais do aparato justaglomerular dos rins (58). Muito além da função hormonal sistêmica de controle no volume do fluido extracelular e pressão, a Ang II atua diretamente nas células através da ação principal sobre AT1R (Figura 1) (58, 59).

Em determinadas situações patológicas o aumento na geração de Ang II, contribui fisiologicamente com o desequilíbrio de sistemas redox pela produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (em inglês *Reactive Oxygen Species*, ROS), via ativação de NADPH oxidase (NOX) por AT1R. O ROS excedido, estimula a translocação do fator nuclear kappa B (em inglês *Nuclear Factor kappa B*, NF- κ B) ao núcleo e aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias, de moléculas de adesão celular e fibrose, como fator de transformação do crescimento beta (em inglês *Transformation Growth Factor beta*, TGF- β) (58-60). Juntamente a isso, os efeitos sobre AT1R podem induzir uma série de eventos celulares, como aumento de proliferação, hipertrofia, hiperplasia, migração e fibrose tecidual.

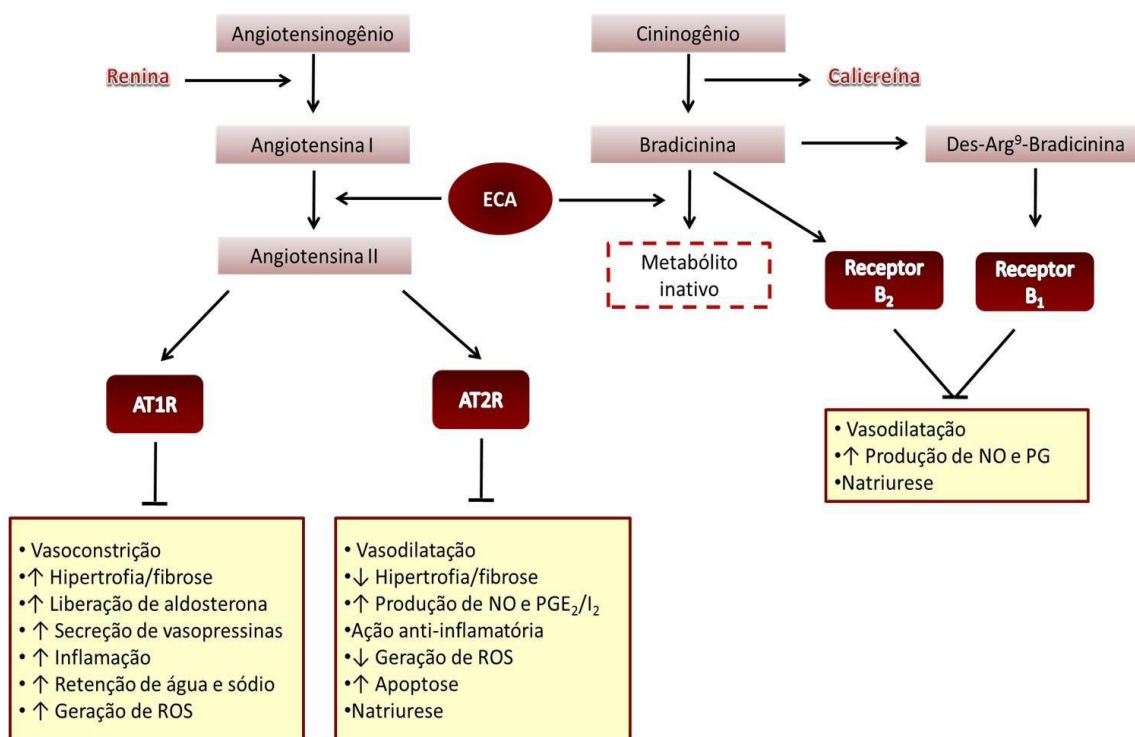


Figura 1. Visão clássica do sistema renina-angiotensina e caliceína-cininas modificado de Nehme et al., 2019 (58).

Importante mencionar que alguns estudos já indicam que os inibidores da ECA, classicamente utilizados como forma de tratamento, podem não ser a indicação terapêutica mais acertada, já que a Ang II se forma majoritariamente de forma independente da ECA (61). Dependendo do tecido e da condição da doença, outras enzimas além da ECA podem atuar como enzimas liberadoras de Ang II, como demonstrado na Figura 2. Endopeptidases, como quimase, catepsina G e caliceína tecidual podem clivar diretamente tanto angiotensinogênio (em inglês *Angiotensinogen*, AGT) quanto Ang I (1-10)/Ang (1-12) gerando Ang II (1-8). As aminopeptidases ligadas à membrana como aminopeptidase neutra (APN), ácida (APA), básica

(APB) e dipeptidil aminopeptidases (DPP) também têm papéis importantes na regulação da meia-vida da Ang II pela formação de derivados da Ang II (Ang III, IV) (58).

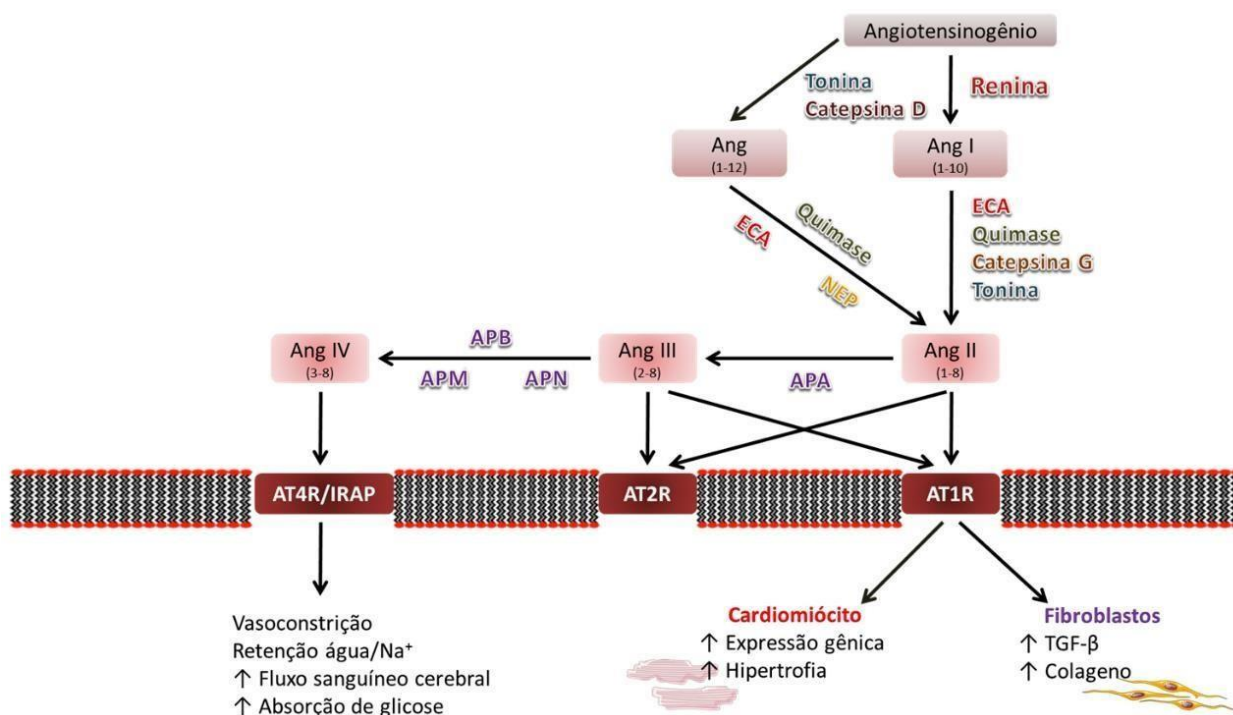


Figura 2. Vias alternativas de geração de Ang II em células da musculatura lisa vascular e cardiomiócitos em condições de hiperglicemia modificado de NEHME et al., 2019 (58)

Existem evidências com células do endotélio microvascular, que a angiogênese induzida pelo fator de crescimento endotelial vascular (em inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) e Ang II (Figura 3) converge na regulação da via RhoA-ROCK (do inglês *Ras homolog family member A - Rho-associated protein kinase*) (62, 63). O estímulo de Ang II sobre AT1R contribui de forma importante com ativação de RhoGTPases (64) promove a angiogênese através de proteínas $G\alpha_{12/13}$ e a estimulação de AT2R consegue suprimir a ativação de RhoA induzida por VEGF via $G\alpha_i$ envolvendo a fosforilação dependente de proteínas quinase serina/treonina. Isso foi observado após tratamento com proteínas RGS específicas (RGS-LSC),

que reduziram o estímulo via AT₁R, enquanto endotoxinas específicas (PTX) e inibidores de quinases (PP2 e PP2A) contribuíram ainda mais com a angiogênese induzida por VEGF e Ang II (65, 66).

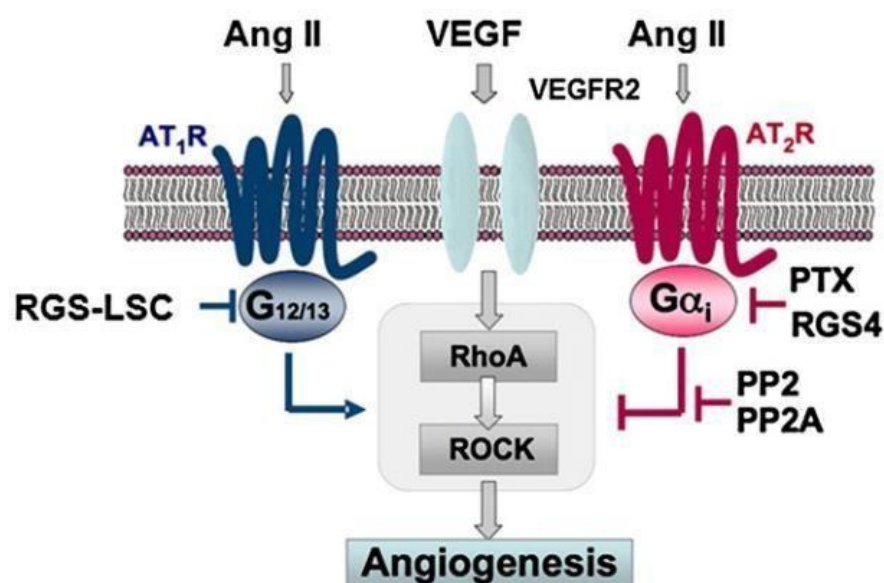


Figura 3. Angiogênese induzida por VEGF e Ang II via RhoA-ROCK (64).

A angiogênese trata-se do processo fisiológico de formação de novos vasos sanguíneos (mecanismo importante para o crescimento celular) e depende da expressão do VEGF. Este por sua vez, é responsável por induzir a proliferação e migração de células endoteliais através de várias cascatas de sinalização, como a via ERK (do inglês *Extracellular signal-Regulated protein Kinases*), uma cadeia de proteínas quinases que atuam no núcleo celular, ativadas pela ligação aos receptores Flt-1 (VEGFR1 do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1*) e KDR (VEGFR2 do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*) na superfície da célula (67, 68).

2.5 Influência do SRA sobre o tecido reprodutivo

Notavelmente trabalhos de análise proteômica e dados de transcriptoma revelaram que a expressão do AT1R e mesmo a Ang II e outros componentes do SRA estão positivamente regulados em focos de endometriose de pacientes (69). De fato, com o AT1R amplamente expresso nos tecidos reprodutivos, incluindo as células estromais endometriais e células da granulosa e cumulus nos ovários, tem se mostrado que o bloqueio desse receptor reduz o crescimento de lesões endometrióticas em modelos murinos e inibe a vascularização que alimenta as células estromais endometriais na lesão (47, 70). Essas evidências corroboram com o papel adicional de Ang II em regular a angiogênese, característica importante na fisiopatologia da endometriose. Uma vez que as hESCs atingem regiões ectópicas são necessários sinais citoprotetores que induzem a proliferação celular e a geração um suprimento sanguíneo apropriado para o crescimento do endometrioma (4).

Nakao *et al.*, (2017) (70) demonstraram um aumento na expressão de AT1R no epitélio glandular endometrial e células estromais de pacientes com endometriose. Recentemente, Zhang *et al.*, (2020) (69) isolaram hESCs de lesões endometrióticas humanas e encontraram aumento da expressão de AT1R, assim como a translocação nuclear de NF- κ B (uma via bem estabelecida que coordena a expressão de citocinas pró-inflamatórias) ativada por Ang II/AT1R. As abordagens genéticas e de bioinformática também destacaram a importância do eixo Ang II/AT1R e identificaram novos polimorfismos nos genes ACE e AT1R que foram associados ao desenvolvimento da endometriose (71-73).

A inflamação crônica e o estresse oxidativo são outras características típicas da endometriose, pois a presença de tecido ectópico na cavidade peritoneal está associada a uma superprodução de prostaglandinas, citocinas, quimiocinas e ROS (16). Aumento nos marcadores de lipoperoxidação (malondialdeído) e danos oxidativos no DNA (8-OH-

desoxiguanosina) e desequilíbrio entre enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase e glutathione peroxidase) foram documentados em pacientes com endometriose (86-88). Ngô *et al.*, (2009) (74), verificaram que as hESCs isoladas de pacientes com endometriose tinham maior capacidade de geração de ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) e maior atividade da superóxido dismutase, quando comparadas às células epiteliais normais.

Em relação às citocinas pró-inflamatórias, alguns dados experimentais sugerem sua influência na mudança das hESCs para um perfil invasivo e migratório. De fato, a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (em inglês *Tumor necrosis factor alpha*, TNF- α), bem como a interleucina 1 β (IL1 β), foram detectados como regulados positivamente no tecido, fluido peritoneal e soro de pacientes com endometriose (75, 76). De acordo com esses dados, já foi mostrado que o bloqueio de AT1R com telmisartan em um modelo murino de endometriose diminui acentuadamente a expressão gênica de IL1 β e IL-6, além da expressão do ativador de plasminogênio tipo-uroquinase (em inglês *urokinase-like plasminogen activator*, uPA), ativador de plasminogênio tipo-tecidual (em inglês *tissue-type plasminogen activator*, tPA), fator de crescimento de fibroblastos (em inglês *Fibroblast growth factors*, FGF), VEGFR, AGT e ACE. Telmisartan também reduziu efetivamente o recrutamento de linfócitos, neutrófilos e macrófagos para as lesões (7).

2.6 Sistema Plasminogênio-Plasmina (PPS)

O PPS é um sistema de proteólise limitada que possui papel essencial em uma série de processos fisiológicos básicos que variam desde a fibrinólise sanguínea até cicatrização, fibrose e migração celular. Na fisiologia endometrial o PPS também tem papel importante regulando processos biológicos dependentes de degradação de matriz extracelular como a ovulação,

menstruação e implantação embrionária. Quando o PPS está desregulado, as implicações refletem-se principalmente em alterações da interação célula-matriz e migração celular, como aquelas observadas na progressão tumoral e também na endometriose (77-79).

O principal componente efetor do PPS é a plasmina. A plasmina é uma serino-protease potente gerada pela proteólise limitada do plasminogênio, uma proenzima ubíqua secretada pelo fígado. Uma vez formada, a plasmina coordena o processo de proteólise da matriz extracelular, seja por degradar diretamente proteínas como fibrina, colágeno, laminina e fibronectina, ou por ativar as metaloproteinases de matriz (MMPs). Dessa forma, a ativação do PPS pode potencializar o processo de proteólise pericelular aumentando a capacidade migratória e invasiva das células (80-82). Outra função crítica da plasmina formada pela ativação do PPS é a regulação da proliferação celular. De fato, a plasmina liberada no microambiente pericelular é capaz de clivar diferentes fatores de crescimento gerando suas formas maduras ativas como o EGF, VEGF e TGF (79).

Outros componentes importantes do PPS são os ativadores de plasminogênio. Existem dois principais ativadores de plasminogênio, o uPA e o tPA que atuam de forma conjunta, gerando plasmina ativa. O tPA é classicamente reconhecido por sua importância sistêmica na regulação da coagulação, através do processo de fibrinólise. O uPA atua principalmente nos tecidos já que sua atividade depende da ligação ao receptor do ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (em inglês *urokinase-like plasminogen activator receptor*, uPAR) (77-78).

O uPAR é ancorado à membrana plasmática por uma porção glicosil fosfatidilinositol e sua ligação ao uPA contribui com a migração celular, por coordenar a proteólise, adesão e sinalização da MEC. O uPAR regula uma cascata proteolítica extracelular (Figura 4) ao se ligar com uPA ou seu zimogênio (pró-uPA). A interação uPAR/uPA converte o plasminogênio

ligado ao seu receptor de membrana em plasmina ativa. O PPS cliva pró-uPA, gerando mais plasmina em um *feedback* positivo (Figura 4) (77). Nesse processo ainda participa o tPA sistêmico que está também presente em pequenas quantidades no ambiente extracelular e é expresso por alguns tipos celulares. O tPA tem a função de gerar quantidades basais de plasmina que clivará o pró-uPA amplificando o sinal da cascata (79). Os principais pontos de regulação do PPS são o tPA e o uPA. Inibidores de serino-proteases como o inibidor do ativador de plasminogênio 1 (em inglês *Plasminogen activator inhibitor -1*, PAI-1), também conhecido pelo seu gene codificador SERPINA 1, juntamente com a PAI-2 (do inglês *Plasminogen activator inhibitor -2*) regulam a atividade enzimática do tPA e uPA reduzindo a produção de plasmina ativa (Figura 4). Em condições patológicas o PAI-1 pode contribuir com a inflamação e fibrose tecidual pela deposição de componentes da MEC (77).

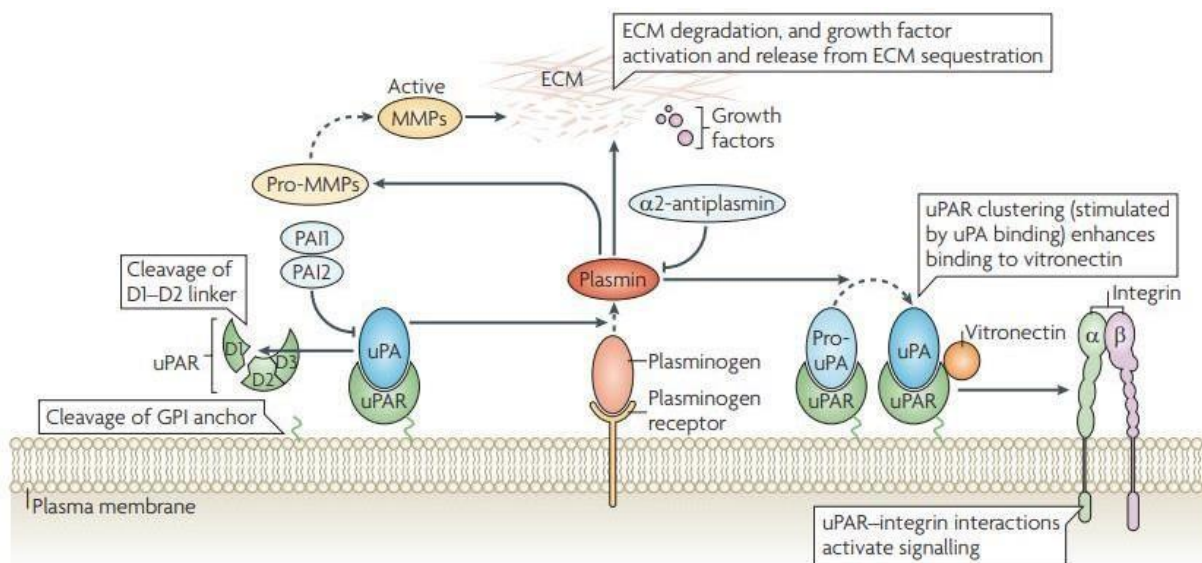


Figura 4. Função e regulação do sistema plasminogênio-plasmina (PPS) (77).

2.7 Influência do PPS sobre o tecido endometrial

Sabe-se que uma interação alterada entre as proteínas da MEC e ESCs derivadas de fragmentos endometriais com menstruação retrógrada parece ser uma explicação razoável para o fato de algumas mulheres desenvolverem endometriose e outras não. Uma produção aumentada de proteases por ESCs parece desempenhar um papel importante, uma vez que a inibição de protease prejudica a implantação ectópica dessas células em modelos de endometriose (83). Neste contexto, o sistema PPS e MMPs são de particular interesse.

Um aumento na expressão de plasminogênio, uPA e uPAR foi detectado por imunohistoquímica em biópsias de endometriose, quando comparadas ao endométrio eutópico (80). Outra descoberta recentemente feita por YANG *et al.*, mostra que o PAI-1 é altamente expresso durante a endometriose sem qualquer relação com o ciclo menstrual, contribuindo para dismenorreia através de lesões ocasionadas pela deposição de componentes da MEC (84).

Alguns estudos indicam que a interleucina 1 (IL-1) é produzida pelo endométrio decidualizado gestacional e pelas membranas placentárias que contêm decídua parietal materna durante o curso normal da gravidez. Recentemente foi demonstrado que o gene codificador β da IL-1 é capaz de sustentar o processo de proteólise pelo PPS em hESCs, regulando a expressão de PAI-1 e u-PA (81, 85). Huang *et al.*, (2017) sugere que níveis mais elevados de expressão de uPAR encontrados no tecido endometrial ectópico seriam regulados pelo NF- κ B, assim, inibidores desse complexo podem reverter a regulação positiva de uPAR (82).

Além disso, há evidências consistentes que ligam a ativação do PPS e a produção de fatores de crescimento maduros. A maioria dos fatores de crescimento são produzidos e liberados como proteínas imaturas que serão posteriormente processadas pela ação proteolítica de MMPs derivadas da ligação uPA/uPAR ou plasmina (86). Nesse contexto, o fator de crescimento epidérmico (em inglês *Epidermal Growth Factor*, EGF) maduro pode potencializar a geração de fatores de crescimento, proliferação e migração celular, uma vez que estimula a liberação de tPA, uPA e PAI-1 por hESC primárias isoladas de pacientes com endometriose (87).

Portanto, a regulação e ativação do PPS durante a endometriose é uma das hipóteses aceitáveis para explicar por que as hESCs podem crescer fora de seu microambiente normal. No entanto, o sinal molecular capaz de desencadear PPS é desconhecido e é motivo de investigação em andamento por nosso grupo.

3. Mapa conceitual

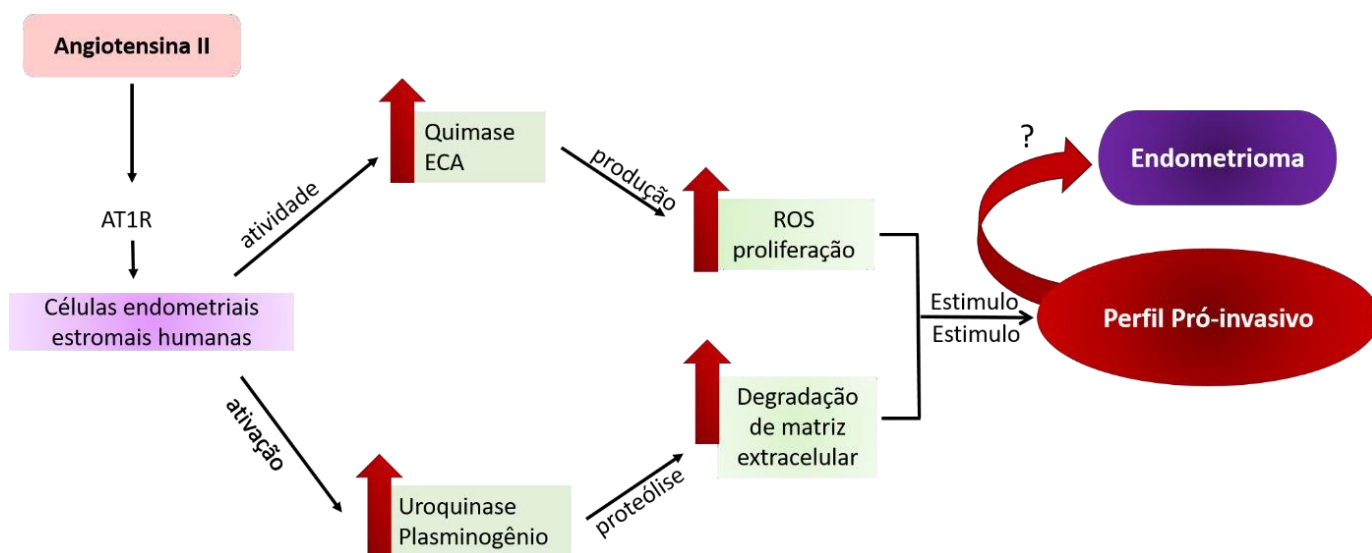


Figura 5. Mapa conceitual.

A fundamentação para explicar a fisiopatologia da endometriose tem gerado teorias sobre fatores envolvendo componentes ambientais, hormonais, imunológicos e genéticos (33-45), mas nenhuma explica a totalidade das possíveis manifestações da doença. As células do estroma endometrial (em inglês *Endometrial Stromal Cells*, ESCs) presente em novos sítios devem se diferenciar em células capazes de formar implantes endometriais ectópicos (5). Neste contexto, sabe-se que uma interação alterada entre as proteínas da matriz extracelular (ECM) e ESCs poderia explicar o estabelecimento do endometrioma.

Por este motivo, o PPS e as metaloproteinases de matriz (MMPs) pelo seu papel fisiológico citado anteriormente (77-79), tornam-se foco de discussão quanto ao seu mecanismo de ativação, que não é exatamente conhecido em hESCs (81-87). Neste trabalho estamos levantando a hipótese de que a angiotensina II (Ang II) pode se auto-regular positivamente e que a interação AngII/AT1R pode ser o fator chave na ativação do PPS e fenótipo invasivo,

migratório e proliferativo de ESC observados durante a endometriose. Desta forma fármacos que inibam geração de Ang II, mas principalmente os seus efeitos sobre AT1R seriam de grande interesse no tratamento da endometriose.

JUSTIFICATIVA

A endometriose é uma condição ginecológica grave e prevalente caracterizada pela presença de estroma do endométrio em regiões extra-uterinas. Os sintomas, como dismenorréia e dor pélvica abdominal são severos, em alguns casos até incapacitantes, e impactam negativamente a qualidade de vida da mulher. Além disso, é uma condição frequentemente associada à infertilidade e câncer. Apesar da existência de diferentes teorias que tentam explicar a fisiopatologia da doença, ainda pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos na alteração do perfil pró-invasivo adquirido pelas células estromais endometriais que acabam se alojando nos diferentes sítios extra-uterinos. A investigação e descoberta desses mecanismos pode ser útil para encontrar marcadores que facilitem um diagnóstico mais preciso e também novos alvos terapêuticos. Para tanto, neste projeto propomos a investigação dos efeitos da angiotensina II como um novo regulador do sistema de degradação de matriz extracelular que pode contribuir para o aumento de proliferação, migração e invasão das células estromais endometriais.

HIPÓTESES

1. Hipótese Nula

Angiotensina II não aumenta atividade de plasmina e ativadores de plasminogênio, proliferação e migração celular através da ativação de receptores AT1 de células endometriais estromais humanas.

2. Hipótese Alternativa

Angiotensina II aumenta atividade de plasmina e ativadores de plasminogênio, proliferação e migração celular através da ativação de receptores AT1 de células endometriais estromais humanas.

OBJETIVOS

1. Principal

Investigar os efeitos modulatórios da angiotensina II na regulação do sistema plasminogênio-plasmina em células endometriais estromais humanas.

2. Secundários

- Investigar a expressão e atividade enzimática dos principais componentes envolvidos na geração e metabolismo das angiotensinas em hESCs estimuladas ou não com Ang II;
- Investigar a expressão e atividade enzimática dos principais componentes envolvidos na geração e metabolismo das angiotensinas no útero de ratas Wistar Kyoto e ratas espontaneamente hipertensas da linhagem SHR;
- Investigar os efeitos da Ang II sobre a expressão e atividade enzimática dos principais ativadores de plasminogênio, o do tipo uroquinase e o do tipo tecidual em hESCs;
- Investigar a modulação da Ang II e a participação do receptor AT1R sobre a produção de plasmina, degradação de matriz extracelular e fibrina em hESCs;
- Investigar os efeitos da Ang II sobre a viabilidade, proliferação e expressão de fatores de crescimento em hESCs;
- Investigar os efeitos da Ang II sobre a expressão de citocinas inflamatórias, dano oxidativo e vias sensíveis às espécies reativas de oxigênio (ROS) em hESCs.

A seguir, os resultados obtidos nesta dissertação serão apresentados na forma de um artigo científico a ser submetido ao periódico **Fertility and Sterility**.

REFERÊNCIAS

1. GLUDICE, L. C. Clinical practice endometriosis. **N Engl J Med**, v. 362, n. 25, p. 2389-8, 2010. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20573927/>>. Acesso em Ago. de 2022.
2. MACER, Matthew Latham; TAYLOR, Hugh S. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. **Obstetrics and Gynecology Clinics**, v. 39, n. 4, p. 535-549, 2012.
3. GIUDICE LC, KAO LC. Endometriosis. **Lancet**, v. 364, p. 1789-99, 2004. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15541453/>>. Acesso em Ago. de 2022.
4. EDWARDS, Andrew K. et al. Animal models for anti-angiogenic therapy in endometriosis. **Journal of reproductive immunology**, v. 97, n. 1, p. 85-94, 2013.
5. VERCELLINI, Paolo et al. Endometriosis: pathogenesis and treatment. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 5, p. 261-275, 2014. Disponível em <www.nature.com/nrendo>. Acesso em Ago. de 2022.
6. VALLE, Rafael F.; SCIARRA, John J. Endometriosis: treatment strategies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 997, n. 1, p. 229-239, 2003.
7. NENICU, A. et al. Combined blockade of angiotensin II type 1 receptor and activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ by telmisartan effectively inhibits vascularization and growth of murine endometriosis-like lesions. **Human reproduction**, v. 29, n. 5, p. 1011-1024, 2014.
8. HERR, D.; BEKES, I.; WULFF, C. Local renin-angiotensin system in the reproductive system. **Front Endocrinol.** 2013. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24151488/>>. Acesso em Ago. de 2022.

9. KUMAR, Rajesh et al. The intracrine renin–angiotensin system. **Clinical science**, v. 123, n. 5, p. 273-284, 2012.
10. BELLELIS, Patrick et al. Epidemiological and clinical aspects of pelvic endometriosis: series of cases. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, p. 467-471, 2010.
11. BELLELIS, Patrick; PODGAEC, Sergio; ABRÃO, Maurício Simões. Environmental factors and endometriosis. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, p. 456-461, 2011.
12. URBANETZ, Almir Antonio; ANDRAUS, Andrea Maria. Endometriose: epidemiologia e aspectos clínicos. **Femina**, p. 249-255, 1999.
13. SINAII, Ninet et al. Treatment utilization for endometriosis symptoms: a cross-sectional survey study of lifetime experience. **Fertility and sterility**, v. 87, n. 6, p. 1277-1286, 2007.
14. GAO, Xin et al. Economic burden of endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 86, n. 6, p. 1561-1572, 2006.
15. MCLEOD, Brandi S.; RETZLOFF, Matthew G. Epidemiology of Endometriosis:: An Assessment of Risk Factors. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 53, n. 2, p. 389-396, 2010.
16. SAMIMI, Mansooreh et al. The role of inflammation, oxidative stress, angiogenesis, and apoptosis in the pathophysiology of endometriosis: Basic science and new insights based on gene expression. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 11, p. 19384-19392, 2019. Disponível em <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.28666>>. Acesso em Ago. de 2022.

17. SAMPSON, John A. Endometrial carcinoma of the ovary, arising in endometrial tissue in that organ. **Archives of Surgery**, v. 10, n. 1, p. 1-72, 1925.
18. SCOTT, ROGER B. Malignant changes in endometriosis. **Obstetrics & Gynecology**, v. 2, n. 3, p. 283-289, 1953.
19. FUKUNAGA, M. et al. Ovarian atypical endometriosis: its close association with malignant epithelial tumours. **Histopathology**, v. 30, n. 3, p. 249-255, 1997.
20. NESS, Roberta B. Endometriosis and ovarian cancer: thoughts on shared pathophysiology. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 189, n. 1, p. 280-294, 2003.
21. GADDUCCI, Angiolo; LANFREDINI, Nora; TANA, Roberta. Novel insights on the malignant transformation of endometriosis into ovarian carcinoma. **Gynecological endocrinology**, v. 30, n. 9, p. 612-617, 2014.
22. NEZHAT, Farr et al. Malignant transformation of endometriosis and its clinical significance. **Fertility and sterility**, v. 102, n. 2, p. 342-344, 2014.
23. NEZHAT, Farr Reza et al. The link between endometriosis and ovarian cancer: clinical implications. **International Journal of Gynecologic Cancer**, v. 24, n. 4, 2014.
24. ABRAO, M. S. et al. Tumor markers in endometriosis. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 66, n. 1, p. 19-22, 1999.
25. VIGANÒ, Paola et al. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 18, n. 2, p. 177-200, 2004.
26. HADFIELD, Ruth et al. Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. **Human Reproduction**, v. 11, n. 4, p. 878-880, 1996.

27. BALLARD, Karen; LOWTON, Karen; WRIGHT, Jeremy. What's the delay? A qualitative study of women's experiences of reaching a diagnosis of endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 86, n. 5, p. 1296-1301, 2006.
28. SANTOS, Tânia Mara Vieira et al. Lag time between onset of symptoms and diagnosis of endometriosis. **Einstein (São Paulo)**, v. 10, p. 39-43, 2012.
29. BAZOT, Marc et al. Diagnostic accuracy of physical examination, transvaginal sonography, rectal endoscopic sonography, and magnetic resonance imaging to diagnose deep infiltrating endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 92, n. 6, p. 1825-1833, 2009.
30. HUDELIST, G. et al. Transvaginal sonography vs. clinical examination in the preoperative diagnosis of deep infiltrating endometriosis. **Ultrasound in obstetrics & gynecology**, v. 37, n. 4, p. 480-487, 2011.
31. BAZOT, Marc; DARAÏ, Emile. Sonography and MR imaging for the assessment of deep pelvic endometriosis. **Journal of minimally invasive gynecology**, v. 12, n. 2, p. 178-185, 2005.
32. SALOMÉ, Dara Galo Marques et al. Endometriose: epidemiologia nacional dos últimos 5 anos. **Revista de Saúde**, v. 11, n. 2, p. 39-43, 2020.
33. SAMPSON, John A. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. **The American journal of pathology**, v. 3, n. 2, p. 93, 1927.
34. PODGAEC, S. et al. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. **Human reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1373-1379, 2007.

35. EYSTER, Kathleen M. et al. Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrium. **Fertility and sterility**, v. 88, n. 6, p. 1505-1533, 2007.
36. HALME, Jouko et al. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. **Obstetrics and gynecology**, v. 64, n. 2, p. 151-154, 1984.
37. LIU, D. T. Y.; HITCHCOCK, A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 93, n. 8, p. 859-862, 1986.
38. REDWINE, David B. 'Invisible' microscopic endometriosis: a review. **Gynecologic and obstetric investigation**, v. 55, n. 2, p. 63-67, 2003.
39. MEYER, Robert. Über den staude der frage der adenomyosites adenomyoma in allgemeinen und adenomyometritis sarcomastosa. **Zentralb Gynakol.**, v. 36, p. 745, 1919.
40. NISOLLE, Michelle; DONNEZ, Jacques. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. **Fertility and sterility**, v. 68, n. 4, p. 585-596, 1997.
41. JUBANYIK, Karen J.; COMITE, Florence. Extrapelvic endometriosis. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, v. 24, n. 2, p. 411-440, 1997.
42. JIANG, Xiuxian et al. Microsatellite analysis of endometriosis reveals loss of heterozygosity at candidate ovarian tumor suppressor gene loci. **Cancer research**, v. 56, n. 15, p. 3534-3539, 1996.
43. GOGUSEV, Jean et al. Detection of DNA copy number changes in human endometriosis by comparative genomic hybridization. **Human genetics**, v. 105, n. 5, p. 444-451, 1999.

44. KENNEDY, Stephen. Genetics of endometriosis: a review of the positional cloning approaches. In: **Seminars in reproductive medicine**. Copyright© 2003 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662, 2003. p. 111-118.
45. BISCHOFF, Farideh Z.; SIMPSON, Joe Leigh. Heritability and molecular genetic studies of endometriosis. **Human reproduction update**, v. 6, n. 1, p. 37-44, 2000.
46. RUSSO, L.; WOOLMOUGH, E.; HEATLEY, M. K. Structural and cell surface antigen expression in the rete ovarii and epoophoron differs from that in the Fallopian tube and in endometriosis. **Histopathology**, v. 37, n. 1, p. 64-69, 2000.
47. HERR, D.; BEKES, I.; WULFF, C. Local renin-angiotensin system in the reproductive system. *Front Endocrinol* 4: 150. 2013.
48. FEDELE, Luigi et al. The recurrence of endometriosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 734, n. 1, p. 358-364, 1994.
49. BUSACCA, Mauro et al. Recurrence of ovarian endometrioma after laparoscopic excision. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 180, n. 3, p. 519-523, 1999.
50. DO NASCIMENTO SANTOS, Camila Maria et al. Tratamento farmacológico para endometriose. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e52810716104-e52810716104, 2021.
51. SCHINDLER, Adolf E. et al. Early treatment of endometriosis with GnRH-agonists: impact on time to recurrence. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 93, n. 2, p. 123-125, 2000.
52. TAYLOR, Hugh S. et al. Treatment of endometriosis-associated pain with elagolix, an oral GnRH antagonist. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 1, p. 28-40, 2017.

53. TELIMAA, S.; PUOLAKKA, J.; KAUPPILA, A. Placebo-controlled comparison of danazol and high-dose medroxyprogesterone acetate in the treatment of endometriosis. **Gynecological Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 13-23, 1987.
54. DLUGI, Alexander M. et al. Lupron depot (leuprolide acetate for depot suspension) in the treatment of endometriosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. **Fertility and sterility**, v. 54, n. 3, p. 419-427, 1990.
55. VENTURINI, Pier Luigi et al. Endocrine, metabolic, and clinical effects of gestrinone in women with endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 52, n. 4, p. 589-595, 1989.
56. BADER, Michael. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 50, p. 439-465, 2010.
57. FERRARIO, Carlos M. Role of angiotensin II in cardiovascular disease—therapeutic implications of more than a century of research. **Journal of the Renin-angiotensin-aldosterone System**, v. 7, n. 1, p. 3-14, 2006.
58. NEHME, Ali et al. An update on the tissue renin angiotensin system and its role in physiology and pathology. **Journal of cardiovascular development and disease**, v. 6, n. 2, p. 14, 2019.
59. SANTOS, Robson Augusto S. dos; FAGUNDES MOURA, Cristiane R.; SILVA, Ana Cristina Simões. Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. **Rev. bras. hipertens**, p. 227-236, 2000.
60. EGUCHI, Satoru et al. Understanding angiotensin II type 1 receptor signaling in vascular pathophysiology. **Hypertension**, v. 71, n. 5, p. 804-810, 2018.

61. INOUE, Nao et al. Effects of chymase inhibitor on angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm development in apolipoprotein E-deficient mice. **Atherosclerosis**, v. 204, n. 2, p. 359-364, 2009.
62. FUJISAWA, Kazuko et al. Identification of the Rho-binding domain of p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 38, p. 23022-23028, 1996.
63. EGAMI, Kimiyasu et al. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 1, p. 67-75, 2003.
64. CARBAJO-LOZOYA, Javier et al. Angiotensin II modulates VEGF-driven angiogenesis by opposing effects of type 1 and type 2 receptor stimulation in the microvascular endothelium. **Cellular signalling**, v. 24, n. 6, p. 1261-1269, 2012.
65. BENNDORF, Ralf et al. Angiotensin II type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor–induced migration and in vitro tube formation of human endothelial cells. **Circulation research**, v. 93, n. 5, p. 438-447, 2003.
66. FALCÓN, Beverly L. et al. Angiotensin II Type 2 Receptor–Mediated Gene Expression Profiling in Human Coronary Artery Endothelial Cells. **Hypertension**, v. 45, n. 4, p. 692-697, 2005.
67. FERRARA, Napoleone; GERBER, Hans-Peter; LECOUTER, Jennifer. The biology of VEGF and its receptors. **Nature medicine**, v. 9, n. 6, p. 669-676, 2003.
68. KROLL, Jens; WALTENBERGER, Johannes. The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 51, p. 32521-32527, 1997.

69. ZHANG, Zhimin et al. Involvement of angiotensin II receptor type 1/NF- κ B signaling in the development of endometriosis. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 20, n. 4, p. 3269-3277, 2020. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32855697/>> Acesso em Ago. de 2022.
70. NAKAO, Takehiro et al. Expression of angiotensin II types 1 and 2 receptors in endometriotic lesions. **Gynecologic and obstetric investigation**, v. 82, n. 3, p. 294-302, 2017.
71. KOWALCZYŃSKA, Liliana J. et al. Endometriosis and RAS system gene polymorphisms: the association of ACE A2350G polymorphism with endometriosis in Polish individuals. **DNA and Cell Biology**, v. 33, n. 5, p. 328-335, 2014.
72. LIU, Fangmei et al. In search of key genes associated with endometriosis using bioinformatics approach. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 194, p. 119-124, 2015. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26366788/>> Acesso em Ago. de 2022.
73. ZHANG, Zhimin et al. Analysis of key candidate genes and pathways of endometriosis pathophysiology by a genomics-bioinformatics approach. **Gynecological Endocrinology**, 2019.
74. NGÔ, Charlotte et al. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. **The American Journal of Pathology**, v. 175, n. 1, p. 225-234, 2009. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19498006/>> Acesso em Ago. de 2022.
75. BERGQVIST, Agneta et al. Interleukin 1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in endometriotic tissue and in endometrium. **Fertility and sterility**, v. 75, n. 3, p. 489-495, 2001. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11239529/>> Acesso em Ago. de 2022.

76. SIKORA, Justyna; MIELCZAREK-PALACZ, Aleksandra; KONDERA-ANASZ, Zdzislawa. Imbalance in Cytokines from Interleukin-1 Family–Role in Pathogenesis of Endometriosis. **American journal of reproductive immunology**, v. 68, n. 2, p. 138-145, 2012. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22537218/>> Acesso em Ago. de 2022.
77. SMITH, Harvey W.; MARSHALL, Chris J. Regulation of cell signalling by uPAR. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 1, p. 23-36, 2010.
78. CAMMALLERI, Maurizio et al. The uPAR system as a potential therapeutic target in the diseased eye. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 925, 2019. Disponível em <<https://www.mdpi.com/2073-4409/8/8/925>> Acesso em Ago. de 2022.
79. DERYUGINA, Elena I.; QUIGLEY, James P. Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.
80. FERNÁNDEZ-SHAW, Sylvia et al. Plasminogen activators in ectopic and uterine endometrium. **Fertility and sterility**, v. 63, n. 1, p. 45-51, 1995. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7805923/>> Acesso em Ago. de 2022.
81. CHUNG, Hye-Won et al. Interleukin-1 β regulates urokinase plasminogen activator (u-PA), u-PA receptor, soluble u-PA receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 messenger ribonucleic acid expression in cultured human endometrial stromal cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 3, p. 1332-1340, 2001.
82. HUANG, Wenqing et al. Upregulation of CFTR in patients with endometriosis and its involvement in NF κ B-uPAR dependent cell migration. **Oncotarget**, v. 8, n. 40, p.

- 66951, 2017. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28978008>> Acesso em Ago. de 2022.
83. SILLEM, Martin et al. Ectopic growth of endometrium depends on its structural integrity and proteolytic activity in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) model of endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 66, n. 3, p. 468-473, 1996. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8751750/>> Acesso em Ago. de 2022.
84. YANG, Bingxin et al. Immunoreactivity of plasminogen activator inhibitor 1 and its correlation with dysmenorrhea and lesional fibrosis in adenomyosis. **Reproductive Sciences**, v. 28, n. 8, p. 2378-2386, 2021.
85. KAUMA, Scott et al. Interleukin-1 β , human leukocyte antigen HLA-DR α , and transforming growth factor- β expression in endometrium, placenta, and placental membranes. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 163, n. 5, p. 1430-1437, 1990.
86. SILLEM, M. et al. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor is over-expressed in uterine endometrium from women with endometriosis. **Molecular human reproduction**, v. 3, n. 12, p. 1101-1105, 1997.
87. MIYAUCHI, Akito et al. Regulation of the plasminogen activator/plasmin system by epidermal growth factor in cultured human endometrial cells. **Human Reproduction**, v. 10, n. 12, p. 3284-3288, 1995. Disponível em <<https://academic.oup.com/humrep/article/10/12/3284/626916>> Acesso em Ago. de 2022.
88. NY, Tor et al. Role of plasminogen activators and their inhibitors in ovulation and reproduction. 1994.

89. LERMAN, Lilach O. et al. Animal models of hypertension: an overview. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 146, n. 3, p. 160-173, 2005. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16131455>> Acesso em Ago. de 2022.
90. ROSZKOWSKA-CHOJECKA, Malwina M. et al. Role of chymase in blood pressure control, plasma and tissue angiotensin II, renal haemodynamics, and excretion in spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 43, n. 5, p. 392-401, 2021. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33687310/>> Acesso em Ago. de 2022.
91. KAO, SHU-HUEI et al. Oxidative damage and mitochondrial DNA mutations with endometriosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1042, n. 1, p. 186-194, 2005. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15965062/>> Acesso em Ago. de 2022.
92. SINGH, Abhay K. et al. Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. **Reproductive toxicology**, v. 42, p. 116-124, 2013. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23994512/>> Acesso em Ago. de 2022.
93. TURKYILMAZ, Esengul et al. Evaluation of oxidative stress markers and intra-extracellular antioxidant activities in patients with endometriosis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 199, p. 164-168, 2016. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26930044/>> Acesso em Ago. de 2022.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De uma maneira geral, os resultados deste trabalho são úteis para entender como a Ang II pode modular um dos principais sistemas de proteólise pericelular e de degradação de matriz extracelular, o sistema plasminogênio-plasmina. O PPS é importante para uma série de eventos fisiológicos no organismo, mas também se encontra desregulado em doenças como câncer e endometriose (84, 86, 88). Na endometriose, as células estromais endometriais estão com o PPS ativado, o que faz com que elas adquiram um potencial pró-migratório, proliferativo e pró-invasivo (80-82). Dessa forma, na endometriose as hESCs são capazes de migrar, invadir, proliferar e se estabelecer em microambientes diferentes fora da cavidade uterina (1-6). Existem várias teorias que tentam explicar como isso ocorre (1-4, 36, 37), no entanto, os sinais moleculares que induzem o PPS e potencializam o processo de proteólise pericelular nas hESCs ainda são desconhecidos. Os resultados deste trabalho sugerem que a Ang II pode ser um desses sinais. Um resumo do mecanismo e dos nossos achados principais está ilustrado abaixo na Figura 6.

Os dados confirmaram indícios já apontados na literatura (8, 9, 47) de que o endométrio e as hESCs expressam os componentes básicos de resposta às angiotensinas, como o AGT, o receptor AT1 de Ang II (AT1R) e a enzima conversora de angiotensina (ACE). Além disso, detectamos atividade basal de várias outras enzimas que geram Ang II (como a quimase e catepsina G), e das aminopeptidases de membrana (como as aminopeptidases ácida, neutra, básica e as dipeptidil-aminopeptidases) que são responsáveis pelo metabolismo e degradação de Ang II (58). Quando investigamos as hESCs tratadas com Ang II observamos um aumento na expressão de AGT, AT1R e quimase, e também na atividade basal das enzimas geradoras de Ang II, o que sugere que a própria Ang II pode atuar em um mecanismo de auto regulação positiva, modulando a sua própria produção e metabolismo. Isso foi confirmado quando

comparamos as atividades das enzimas geradoras/metabolizadoras de Ang II no útero de ratas espontaneamente hipertensas (do inglês, *spontaneously hypertensive*, SHR) versus ratas controle da linhagem Wistar Kyoto. Os ratos da linhagem SHR são um modelo bem estabelecido de hipertensão e apresentam níveis circulantes mais elevados de Ang II (89, 90). De fato, observamos um aumento na atividade das enzimas geradoras de Ang II (como ACE, quimase e catepsina G) nos extratos de útero de animais SHR, assim como na expressão de AT1R e AGT.

Sabendo que os componentes necessários para a formação, metabolismo e o principal receptor de Ang II estão expressos e ativos nas hESCs buscamos investigar a capacidade do eixo Ang II/AT1R em modular o PPS. De forma muito interessante, encontramos que a Ang II é capaz de induzir a expressão e atividade enzimática dos principais ativadores de plasminogênio (do inglês *Plasminogen*, PLG), o tPA e o uPA. A Ang II também induziu a expressão do receptor do uPA, o uPAR, que é uma proteína ancorada à membrana plasmática e que tem a função de localizar parte da ativação do PLG na superfície das células. Mais do que aumentar a expressão dos componentes do PPS, o estímulo com Ang II foi capaz de gerar plasmina ativa tanto na superfície das hESCs quanto no meio de cultura condicionado, o que sugere que a plasmina seja formada na superfície da hESCs sendo o sinal de ativação amplificado para o meio extracelular. Possivelmente o mecanismo envolva uma ação coordenada entre PLG, tPA, uPA/uPAR atuando em um “loop” de retroalimentação positiva que amplifica a geração de plasmina (Figura 6). O PLG é capaz de ligar-se na membrana das células através da proteína ligante de PLG (em inglês *plasminogen binding protein*, PLGBP), já o tPA é normalmente encontrado na circulação sistêmica, mas também está presente em menores concentrações no fluido extracelular e é expresso por algumas células, entre elas as hESCs (77-79). O tPA é capaz de ativar o PLG em plasmina independente da ligação a um

receptor de membrana, já o uPA atua sobre o PLG preferencialmente quando está complexado com o uPAR (77, 79). Nesse sistema, o tPA ativa pequenas quantidades de PLG gerando a plasmina necessária para converter o complexo pró-uPA/uPAR em uPA/uPAR ativo (Figura 6). Uma vez ativado o complexo uPA/uPAR tem a função de amplificar a geração de plasmina potencializando a ação proteolítica pericelular (77-79).

A plasmina é uma serino-protease capaz de degradar diversas proteínas da matriz extracelular, ativar as metaloproteases de matriz e produzir as formas maduras de fatores de crescimento como EGF, TGF e VEGF (78, 79, 87). De uma maneira geral, o aumento de plasmina no ambiente pericelular está associado com aumento de migração, proliferação e capacidade invasiva das células, justamente por potencializar a degradação de matriz extracelular e formação de fatores de crescimento (80, 88, 91). Nossos dados estão de acordo com esses eventos. A Ang II aumentou a capacidade do meio condicionado das hESCs em degradar proteínas de matriz como aquelas encontradas no matrigel e fibrina e também aumentou a proliferação e viabilidade das hESCs. Esse aumento de proliferação se relacionou diretamente com o aumento de expressão de diferentes fatores de crescimento como o EGF, FGF/FGFR e o VEGF, que é um fator extremamente importante na regulação de angiogênese. A angiogênese é uma etapa fundamental na endometriose, uma vez que as hESCs precisam de um suprimento adequado de sangue e oxigênio para se estabelecer em outros microambientes (64). Dessa forma, nossos dados sugerem que a Ang II pode participar no aumento e maturação de VEGF pelas hESCs, que, por sua vez, vai coordenar o processo de angiogênese nas células endoteliais.

Além da angiogênese, a relação entre inflamação, geração e sinalização via espécies reativas de oxigênio (ROS) são eventos bem documentados tanto em pacientes com endometriose, quanto em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (16, 63, 69, 70). O aumento das citocinas pró-inflamatórias clássicas reguladas por NF- κ B como TNF α , IL1 β e IL6, e

evidências de dano oxidativo já foram descritos em endometriomas e hESCs isoladas de pacientes (74-76, 91-93). Aqui neste trabalho, trazemos a evidência de que a Ang II possa estar também envolvida nesses eventos. As hESCs tratadas com Ang II apresentaram aumento na expressão proteica de diferentes citocinas pró-inflamatórias, indícios de dano oxidativo em proteínas e produção de superóxido. A Ang II aumentou a expressão de NADPH oxidase (p47hox), uma proteína envolvida na sinalização dependente de ROS e relacionada com regulação de migração e proliferação celular (92). Outro dado interessante que obtivemos indicou que a modulação do PPS pela Ang II parece ser dependente do receptor AT1R, uma vez que o tratamento das hESCs com losartana reduziu significativamente a geração de plasmina ativa. Todos esses resultados estão de acordo com outros já publicados que mostram a eficiência do tratamento com telmisartana em reduzir o endometrioma, angiogênese, ROS e inflamação em um modelo de endometriose peritoneal em camundongos (7).

Por fim, podemos concluir que a Ang II regula positivamente os ativadores de plasminogênio tPA e uPA/uPAR nas hESCs, gerando plasmina ativa e disparando vias inflamatórias, proliferativas e associadas à produção de ROS. O mecanismo é dependente do receptor AT1 de Ang II e diretamente relacionado ao aumento no potencial de proteólise pericelular e de degradação de matriz extracelular, evento que é crucial no estabelecimento da endometriose. Os nossos dados reforçam que classe de fármacos antagonistas do receptor AT1R possam ser úteis no tratamento da endometriose principalmente por reduzir a ativação do PPS induzida por Ang II.

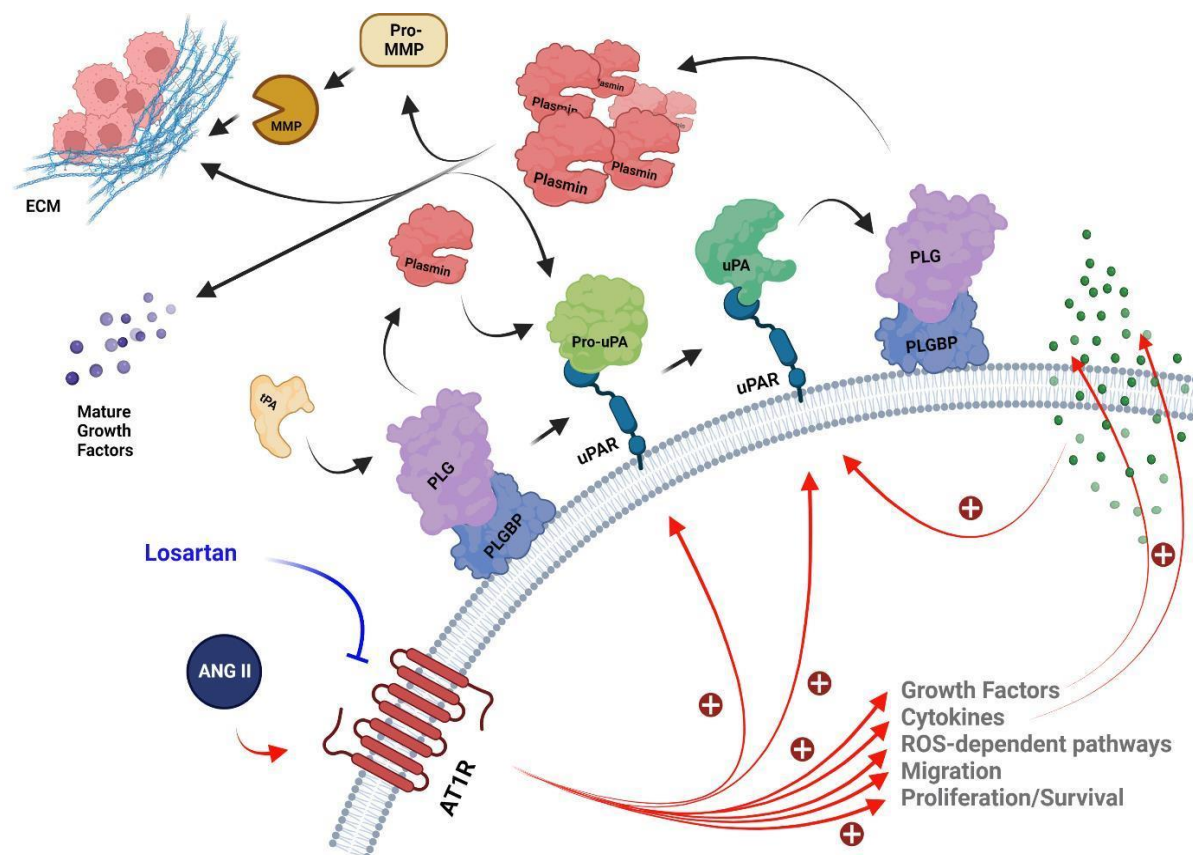


Figura 6. Mecanismos envolvidos na modulação do sistema plasminogênio-plasmina (PPS) pela angiotensina II (Ang II) nas células estromais endometriais humanas (hESCs).

ANEXOS

1. Documento de aprovação de pesquisa no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

Projeto

2021/0477

Pesquisadores:**PAULA BARROS TERRACIANO**

PAMELA ZANON

EDUARDO PANDOLFI PASSOS

MARINA NIADA CRISPIM

MARKUS BERGER OLIVEIRA

Número de Participantes: 0

Título: Efeitos da angiotensina II na regulação do sistema plasminogênio-plasmina em células endometriais estromais humanas: possível papel na patogenia da endometriose.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG).



Assinado digitalmente por:
URSULA DA SILVEIRA MATTE

Grupo de Pesquisa e Pós-graduação

10/01/2022 20:39:32

<https://sigasim-externo.fcps.edu.br/pesquisa/publico/cadastropoio/conferenciaArquivo.shtml?codigo=1885837>

2. Justificativa para a dispensa de TCLE

Conforme orientado no parecer N.º 5.113.594 foi realizada uma primeira consultoria com o CEP. Após contato com o membro da UARP para dispensa do TCLE, adicionamos o TCLE do projeto de origem das células, deixando claro que na assinatura do termo as doadoras ficaram cientes de que o material biológico seria mantido em biorrepositório para projetos futuros sem a necessidade de um novo recrutamento para autorização do manejo das células, assim como, a realização desta pesquisa não levaria a benefício direto das doadoras, sendo inteiramente experimental e importante para descobertas da fisiopatologia de doenças do tecido endometrial. Esclarecimento segundo orientação do membro da UARP segue abaixo:

As amostras de tecido endometrial que serão utilizadas nessa proposta foram obtidas pelo projeto de número 2015-0233 intitulado “Análise endometrial de receptores de estrogênio, progesterona e proteína ki67 de pacientes inférteis submetidas a tratamento com reprodução assistida: uma coorte pareada” aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA. As participantes do estudo foram sete pacientes saudáveis em atendimento pelo Serviço de Ginecologia e Obstetrícia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (RS, Brasil) no setor de infertilidade, que está localizado no Centro Cirúrgico Ambulatorial (CCA). O professor Eduardo Pandolfi Passos, proponente do projeto que aplicou o TCLE (Anexo 1) às mulheres, cujos materiais biológicos estão mantidos em biorrepositório, é um dos pesquisadores da equipe e concorda em fornecer o material em questão. Os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para as participantes, mas a investigação e descoberta dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da endometriose, podem ser úteis para encontrar marcadores que facilitem um diagnóstico mais preciso e também novos alvos terapêuticos, por isso no momento da assinatura do TCLE aplicado para o projeto 2015-0233, as participantes tiveram ciência de que a amostra coletada

poderia ser utilizada em estudos futuros, sem a necessidade de contato prévio para nova autorização.

Para tanto, os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade das pacientes, bem como de suas respectivas informações associadas, contidas em prontuários e bases de dados do HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE, visto que não será necessário consulta de prontuários ou manejo de dados pessoais das pacientes durante a realização deste estudo.

Após parecer número 5.167.318 foi realizada uma segunda consultoria, onde foi orientado pelo membro da UARP deixar claro questões éticas relacionadas à dispensa de consentimento das participantes. Para tanto, esclarecemos que as participantes elegíveis para o projeto número 2015-0233 não possuíam histórico de alterações endometriais ou ovarianas, logo, eram acompanhadas pelo serviço de infertilidade devido a problemas reprodutivos de seus parceiros, ou seja, essas participantes já foram desassistidas do serviço e realizar um contato necessitaria de busca ativa de dados em prontuários, um processo que poderia causar desconforto desnecessário, além da possibilidade de muitos dados cadastrais já estarem desatualizados por se tratar de um projeto realizado a 6 anos atrás . Ressaltamos que não são esperados benefícios diretos às participantes, ou seja, os resultados obtidos no estudo não implicam em nenhuma repercussão clínica para as participantes. Diante do exposto, considerando a relação risco-benefício justificada acima, propomos a dispensa de novo TCLE para utilização de material biológico proveniente do projeto 2015-0233

3. Curriculum Vitae

DADOS PESSOAIS

Nome: Pamela Zanon

Nascimento: 01/04/1996

Endereço Residencial: Bairro Azenha, Porto Alegre, RS

Telefone de contato: (51) 98242-0268

Endereço eletrônico: zanon.pam@gmail.com
linkedin.com/in/pamela-zanon

RESUMO

Formação técnica em Biotecnologia, SENAI (2014). Graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2019). Iniciou em 2015 no laboratório de Bioquímica Farmacológica do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, onde continua participando de trabalhos envolvidos na identificação, purificação e caracterização molecular de inibidores enzimáticos de origem vegetal. Estagiou no serviço de Hematologia na Unidade de bioquímica Clínica do HCPA (2018-2019) onde participou da avaliação de indicadores clínicos laboratoriais combinados como ferramenta para o diagnóstico precoce de doenças hematológicas. Atualmente é analista clínico no laboratório

do Hospital Materno Infantil Presidente Vargas onde é referência técnica dos setores de Hematologia e Imunologia. Além de realizar análises relacionadas ao Diagnóstico da Fibrose Cística em parceria com o Serviço de Triagem Neonatal (SRTN-RS). Atua como assistente de pesquisa clínica (HCPA-CPC) em vacinas para o COVID-19. Cursa pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia – UFRGS, orientada pelo Prof. Dr. Markus Berger, com o projeto voltado para a elucidação de mecanismos fisiopatológicos de doenças do tecido reprodutivo feminino.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Fev/2020

Mestrado em Ciências da Saúde: Ginecologia e obstetrícia.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
UFRGS, Brasil;

Ago/2015 – Jan/2019

Bacharel em Farmácia.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS,
Brasil;

Jun/2012 – Jul/2014

Curso técnico/profissionalizante em Biotecnologia.

SENAI – Departamento Regional do Paraná,
SENAI/DR/PR, Brasil. Bolsista Integral do(a):
Programa Nacional de Acesso ao Ensino Técnico e
Emprego, PRONATEC, Brasil;

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**Ago/2020-Ago/2020**

Proficiente em língua inglesa.

Universidade La Salle, Brasil;

Abr/2018-Abr/2018

Aplicação de injetáveis (Carga horária: 8h).

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS,
Brasil;**Out/2012-Out/2012**

Tecnologia da Informação. (Carga horária: 14h).

SENAI - Departamento Regional do Paraná,
SENAI/DR/PR, Brasil;**Nov/2012-Nov/2012**

Informática: Pacote Office e Sistema Operacional Linux.

(Carga Horária: 70h).

SENAI - Departamento Regional do Paraná,
SENAI/DR/PR, Brasil;**Out/2012-Out/2012**

Propriedade Intelectual. (Carga horária: 14h).

SENAI - Departamento Regional do Paraná,
SENAI/DR/PR, Brasil;

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, HMIPV, Porto Alegre, RS., Brasil.

Vínculo institucional

Agosto/2021

Empregado : Farmacêutica, Carga horária semanal, 44h.
Contratada como gestão de apoio pelo Hospital São Lucas da PUC, presta serviço como Analista laboratorial no HMIPV, principalmente na área de hematologia, Imunologia e Diagnóstico de fibrose cística. Dentro da imunologia realiza alguns exames hormonais e dosagem de vitaminas, além de uma gama de exames infecciosos solicitados pelo ministério da saúde. Participava de rotinas especiais, conduzindo testes do suor para diagnóstico de fibrose cística.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, RS., Brasil.

Vínculo institucional

Abril/2021

Empregado, Autônomo, Carga Horária semanal, 20h
Assistente de pesquisa clínica, auxiliando na condução de pesquisas relacionadas a vacinas COVID Janssen, Oxford e

Clover. Experiência na utilização do banco de dados REDCap, iMedidata e Vieadoc.

Ago/2015

Voluntária, Iniciação Científica, Carga horária semanal, 20h.
Iniciação científica voluntária no Laboratório de Bioquímica Farmacológica no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, sob orientação de Markus Berger, realizando a identificação, purificação e caracterização molecular e farmacológica de proteínas de origem vegetal, animal e microbiológica;

Fev/2018-Ago/2019

Empregado, Estagiário, Carga horária semanal, 20h.
Estagiário no serviço de hematologia da Unidade de Bioquímica clínica do HCPA, auxiliando no diagnóstico de doença falciforme e talassêmicas, realizando técnicas especiais para o diagnósticos de doenças hemolíticas associadas com deficiência enzimática, fragilidade osmótica eritrocitária, deficiência de fatores de coagulação e Antígenos anti-fosfolipídeos. Validação e controle interno da rotina laboratorial. Participação na pesquisa de ferramentas laboratoriais para auxílio no diagnóstico precoce de sepse;

Jan/2016-Jan/2017

Bolsista, Iniciação Científica, Carga horária semanal, 20h.
Bolsista PIBIC no Laboratório de Bioquímica

Farmacológica do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, com o projeto intitulado: "Mecanismos Fisiopatológicos da insuficiência renal aguda induzida pelo veneno da taturana *Lonomia Obliqua*: O papel dos receptores de Cininas, coagulação intravascular disseminada e Inflamação".

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Vínculo institucional

Set/2019-Dez/2019

Bolsista, Iniciação Tecnológica, Carga horária semanal 20h.

Bolsista de Iniciação Tecnológica (PROBITI) pelo laboratório de Embriologia e diferenciação celular orientado pelo Eduardo Pandolfi Passos;

Ago/2017-Fev/2018

Bolsista, Monitoria Acadêmica,

Carga horária semanal, 20h.

Monitoria Acadêmica especial presencial de reforços em cálculos de bioquímica farmacêutica pelo Programa de apoio à graduação, elaborado atividades complementares e aulas de apoio em cálculos laboratoriais e dúvidas sobre técnicas de dosagem, separação e identificação proteica,

reações enzimáticas e isolamento de material genético
(técnicas eletroforéticas e PCR).

PRÊMIOS E TÍTULOS

- 2019** Destaque com indicação ao prêmio Jovem Pesquisador na modalidade Apresentação oral e poster - Salão UFRGS 2019: SIC - XXXI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, PROPESQ, UFRGS.
- 2018** Destaque com indicação ao prêmio Jovem Pesquisador na modalidade Apresentação oral e poster - Salão UFRGS 2018: SIC - XXX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, PROPESQ, UFRGS.
- 2018** 1º Lugar no Concurso Acadêmico de Pesquisa Científica. 44ª Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos., UFRGS.
- 2017** Destaque de sessão na modalidade Apresentação oral e poster - Salão UFRGS 2017: SIC - XXIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, PROPESQ, UFRGS.

PRODUÇÕES

Artigos completos publicados em periódicos

1. ZANON, PAMELA; PIZZATO, SABRINA BEAL ; DA ROSA, RAFAEL LOPES ; TERRACIANO, PAULA BARROS ; MORAES, JOÃO ALFREDO ; BEYS-DA-SILVA, WALTER ORLANDO ; SANTI, LUCÉLIA ; YATES, JONH R. ; PASSOS, EDUARDO PANDOLFI ; BARJA-FIDALGO, CHRISTINA ; GUIMARÃES, JORGE ALMEIDA ; BERGER, MARKUS . Urine proteomic analysis reveals alterations in heme/hemoglobin and aminopeptidase metabolism during *Lonomia obliqua* venom-induced acute kidney injury. TOXICOLOGY LETTERS, v. 341, p. 11-22, 2021. Citações:2

Resumos publicados em anais de congressos

1. ZANON, P.; ORSO, F. R. ; GHEM, C. ; SCOTTI, L. . Validação da contagem automatizada de células no líquido cefalorraquidiano no equipamento Sysmex. In: 39ª Semana Científica do HCPA. Gestão de pesquisa aplicada à saúde, 2019, Porto Alegre. 39ª Semana Científica do HCPA, 2019.
2. MORKIS, I. V. C. ; GHEM, C. ; ZANON, P. ; TASCA, S. ; SCOTTI, L. . Determinação do intervalo de referência da fração de plaquetas imaturas no

- analisador hematológico Sysmex-XN. In: 39ª Semana Científica do HCPA. Gestão de pesquisa aplicada à saúde, 2019, Porto Alegre. 39ª Semana Científica do HCPA., 2019.
3. ZANON, P.; RAMOS, R. ; SANTI, L. ; SILVA, W. O. B. ; GUIMARAES, J. A. ; BERGER, M. . Alternativas farmacológicas para o controle da geração de angiotensina II e suas aplicações para alterações vasculares.. In: 39ª Semana Científica do HCPA. Gestão de pesquisa aplicada à saúde, 2019, Porto Alegre. 39ª Semana Científica do HCPA., 2019.
 4. ZANON, P.; BARBOSA, M. C. D. ; ORSO, F. R. ; SCOTTI, L. ; GHEM, C. . Avaliação do Índice de Granulócitos imaturos, pró-calcitonina e PCR em pacientes com processo infecciosa.. In: 39ª Semana Científica do HCPA. Tecnologias disruptivas em saúde., 2018, Porto Alegre. 38ª Semana Científica do HCPA, 2018.
 5. MEDEIROS, M. S. ; ZANON, P. ; PUGLIESE, M. ; ROSA, R. L. ; SANTI, L. ; SILVA, W. O. B. ; VERLI, H. ; RAMOS, R. ; GUIMARAES, J. A. ; BERGER, M. . Caracterização de um novo inibidor peptídico de quimase:Efeitos sobre alterações de permeabilidade, proliferação e migração de células vasculares. In: 38ª Semana de Científica do HCPA. Tecnologias disruptivas em saúde., 2018, Porto Alegre. 38ª Semana de Científica do HCPA, 2018.
 6. ZANON, P.; SANTI, L. ; SILVA, W. O. B. ; TERRACIANO, P. B. ; YATES, J.

R. ; RAMOS, R. ; CIRNE-LIMA, E. O. ; GUIMARAES, J. A. ; BERGER, M. .
Caracterização de um novo inibidor de quimase isolado de *Canavalia ensiformis*.
In: 37ª Semana de Científica do HCPA. Pesquisa: crise e resiliência., 2017, Porto Alegre. 37ª Semana de Científica do HCPA., 2017.

7. ZANON, P.; PISCO, J. ; BRONDANI, L. A. ; SANTI, L. ; SILVA, W. O. B. ; YATES, J. R. ; RAMOS, R. ; GUIMARAES, J. A. ; BERGER, M. . CETI, um inibidor de serino proteinases obtido de *Canavalia ensiformes*: isolamento, caracterização bioquímica, estrutural e potencial ação anti-inflamatória sobre enzimas de mastócitos.. In: 36ª Semana de Científica do HCPA, Ciência e Comunidade., 2016, Porto Alegre. 36ª Semana de Científica do HCPA, 2016.

Apresentação de Trabalho

1. ZANON, P.; BERGER, M. . Alternativas farmacológicas para o controle da geração de angiotensina II e suas aplicações para alterações vasculares. 2019. (Apresentação de Trabalho/Outra).
2. ZANON, P.; ROSA, R. L. ; SANTI, L. ; SILVA, W. O. B. ; YATES, J. R. ; RAMOS, R. ; GUIMARAES, J. A. ; BARBOSA, M. C. D. . Efeitos de um novo inibidor peptídico de quimase sobre alterações de permeabilidade vascular, proliferação e migração de células da musculatura lisa de aorta. 2019. (Apresentação de Trabalho/Outra).

3. ZANON, P.; MEDEIROS, M. S. ; PUGLIESE, M. ; ROSA, R. L. ; SANTI, L. ; SILVA, W. O. B. ; VERLI, H. ; RAMOS, R. ; GUIMARAES, J. A. ; BERGER, M. . Efeitos de em novo inibidor peptídico de Quimase sobre alterações de permeabilidade vascular, proliferação e migração de células da musculatura lisa de aorta. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).

4. ZANON, P.; MEDEIROS, M. S. ; PUGLIESE, M. ; ROSA, R. L. ; SANTI, L. ; SILVA, W. O. B. ; VERLI, H. ; RAMOS, R. ; GUIMARAES, J. A. ; BERGER, M. . Potencial farmacológico de um inibidor de serino-proteinases de mastócitos obtido das sementes da *Canavalia ensiformis*. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).

5. ZANON, P.; BARBOSA, M. C. D. ; ORSO, F. R. ; SCOTTI, L. ; GHEM, C. . Potencial farmacológico de um inibidor de serino-proteinases de mastócitos obtido das sementes da *Canavalia ensiformis*. 2018. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

6. ZANON, P.; SANTI, L. ; SILVA, W. O. B. ; TERRACIANO, P. B. ; YATES, J. R. ; RAMOS, R. ; CIRNE-LIMA, E. O. ; GUIMARAES, J. A. ; BERGER, M. . Caracterização bioquímica, estrutural e farmacológica de um novo inibidor de serino-proteinases isolado de *canavalia-ensiformis*: efeitos anti-inflamatórios e inibitórios sobre quimase de célula muscular lisa de aorta?. 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra).

7. ZANON, P.; FIORINI, P. . Fitorremediação de áreas contaminadas com Chumbo utilizando Canavalia Ensiformes L. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
-

EVENTOS

1. 39ª Semana Científica do HCPA. Alternativas farmacológicas para o controle da geração de angiotensina II e suas aplicações para alterações vasculares. 2019. (Exposição).
2. 39ª Semana Científica do HCPA. Validação da contagem automatizada de células no líquido cefalorraquidiano no equipamento Sysmex. 2019. (Outra).
3. 45ª semana acadêmica de estudos farmacêuticos. EFEITOS DE UM NOVO INIBIDOR PEPTÍDICO DE QUIMASE SOBRE ALTERAÇÕES DE PERMEABILIDADE VASCULAR, PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DA MUSCULATURA LISA DE AORTA. 2019. (Feira).
4. XXXI Salão de iniciação científica da UFRGS. Alternativas farmacológicas para o controle da geração de angiotensina II e suas aplicações para alterações vasculares. 2019. (Outra).
5. 38ª Semana Científica do HCPA. Avaliação do Índice de Granulócitos imaturos, pró-calcitonina e PCR em pacientes com processo infecciosa. 2018. (Outra).

6. 44^a semana acadêmica de estudos farmacêuticos. Potencial farmacológico de um inibidor de serino-proteinases de mastócitos obtido das sementes da *Canavalia ensiformis*. 2018. (Feira).
7. II Simpósio Gaúcho de Farmacologia. Potencial farmacológico de um inibidor de serino-proteinases de mastócitos obtido das sementes da *Canavalia ensiformis*. 2018. (Simpósio).
8. XXX Salão de iniciação científica da UFRGS. Efeitos de um novo inibidor peptídico de Quimase sobre alterações de permeabilidade vascular, proliferação e migração de células da musculatura lisa de aorta. 2018. (Outra).
9. 37^a Semana de Científica do HCPA. Caracterização bioquímica, estrutural e farmacológica de um novo inibidor de serino-proteinases isolado de *canavalia-ensiformis*: efeitos anti-inflamatórios e inibitórios sobre quimase de célula muscular lisa de aorta. 2017. (Outra).
10. Conferência técnica Eppendorf. 2017. (Oficina).
11. XXIX, Salão de iniciação científica da UFRGS. Caracterização bioquímica, estrutural e farmacológica de um novo inibidor de serino-proteinases isolado de *canavalia-ensiformis*: efeitos anti-inflamatórios e inibitórios sobre quimase de célula muscular lisa de aorta. 2017. (Outra).

12. 36ª Semana de Científica do HCPA.CETI, um inibidor de serinoproteinases obtido de *Canavalia ensiformes*: isolamento, caracterização bioquímica, estrutural e potencial ação anti-inflamatória sobre enzimas de mastócitos. 2016. (Outra).

13. II Jornada Acadêmica do Curso de Toxicologia Analítica, UFCSPA. 2016. (Encontro).

14. IV Simpósio Nacional de Iniciação Científica e XXII Simpósio de Iniciação Científica da Unifil.Fitorremediação de áreas contaminadas com Chumbo utilizando *Canavalia Ensiformes* L. 2014. (Simpósio).