

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

VICTÓRIA SIMIONATTO ZUCHERATO

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA ADEQUADOS EM PCR
QUANTITATIVO EM TEMPO REAL PARA CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
ENDOMETRIAIS DE FLUXO MENSTRUAL DE MULHERES SAUDÁVEIS E COM
ENDOMETRIOSE**

RIBEIRÃO PRETO
2019

VICTÓRIA SIMIONATTO ZUCHERATO

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA ADEQUADOS EM PCR
QUANTITATIVO EM TEMPO REAL PARA CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
ENDOMETRIAIS DE FLUXO MENSTRUAL DE MULHERES SAUDÁVEIS E COM
ENDOMETRIOSE**

Monografia apresentada ao
Curso de Ciências Biomédicas da
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto como parte dos
requisitos necessários à obtenção
do título de Bacharel em Ciências
Biomédicas com ênfase em
Ciências Básicas da Saúde

Orientadora: Professora Doutora Juliana Meola Lovato

RIBEIRÃO PRETO
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Zucherato, Victória Simionatto

Identificação de genes de referência adequados em PCR quantitativo em tempo real para células tronco mesenquimais endometriais de fluxo menstrual de mulheres saudáveis e com endometriose

34 p.: il; 30 cm

Monografia, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientadora: Meola, Juliana Lovato

1. Endometriose; 2. eMSC de fluxo menstrual; 3. RT-qPCR; 4. Genes de referência estáveis

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos e Silvia e ao meu irmão, Adolpho, que me apoiaram durante todos os anos de graduação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que me ilumina todos os dias.

Aos meus pais, agradeço por serem meu porto seguro e por estarem do meu lado me apoiando em qualquer situação. Ao meu irmão, que está sempre do meu lado me incentivando a ser minha melhor versão.

Às minhas amigas do coração, Laura, Rebeca e Giovanna, por serem tão presentes e serem as melhores amigas que eu poderia ter. A Giulia e Bárbara, por dividirem todos os dias comigo e por serem as melhores colegas de apartamento. Aos grandes amigos Carlos e Bruno, por tornarem meus dias mais leves e me ajudarem tanto durante esses anos. A Gabriel, que esteve comigo durante tanto tempo e que me proporcionou momentos especiais.

Aos meus grandes amigos da minha cidade natal, por estarem comigo independente da distância.

À República Coronelas, por serem a minha família e o meu abrigo durante esse ano e por me proporcionarem tantos momentos incríveis.

Aos membros da Sirius Biotecnologia Jr., por contribuírem tanto para o meu crescimento pessoal e profissional e por toda evolução que tivemos juntos.

Ao Centro Acadêmico Moura Gonçalves, no qual participei todos os anos de graduação, por me proporcionar engajamento em tantas questões político-sociais dentro e fora da Universidade.

Às minhas amigas e colegas de Comissão de Formatura, Nathalia e Danielle, que passaram tantos momentos comigo.

Aos meus colegas de turma, por enfrentarem todos os desafios do curso junto a mim.

A todos os professores com quem tive aula durante a graduação, por todos os ensinamentos transmitidos.

À minha orientadora, Juliana, por toda sabedoria e conhecimento, por me acolher no seu laboratório e por sempre ser tão disponível para me ajudar.

Ao pessoal do laboratório, em especial a Ana, Cristiana, Letícia, Lilian e Rafael, que trabalharam diretamente comigo todos os dias e me ajudaram a desenvolver esse projeto.

À chefe da Seção de Alunos da FMRP, Nadine, por entender todos os desafios que passamos e por sempre ser tão solícita conosco.

A todos os funcionários da FMRP.

Às pacientes que doaram suas amostras para os projetos de pesquisa que envolvem este trabalho.

Agradeço também a FAEPA, FAPESP e INCT/CNPq pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento desse projeto.

RESUMO

Sugere-se que as células-tronco mesenquimais endometriais menstruais (eMSC) tenham relação com a endometriose. Atualmente, são realizados muitos estudos de expressão gênica na doença, buscando genes alvo diferencialmente expressos. É comum normalizar os dados de RT-qPCR utilizando genes de referência mais estáveis. Propusemos avaliar a estabilidade de 32 genes de referência em eMSC de fluxo menstrual de mulheres com e sem endometriose para direcionar experimentos futuros. Grupo endometriose (n = 5): mulheres com diagnóstico laparoscópico de endometriose. Grupo controle (n = 5): pacientes férteis submetidas à laparoscopia para ligadura tubária, sem diagnóstico de endometriose. Nos dois grupos, as pacientes não receberam terapia hormonal por três meses antes da coleta. As eMSC foram isolados por aderência a plástico (P3), caracterizadas por citometria de fluxo, e diferenciadas em adipócitos e osteoblastos. Um total de 32 genes de referência foi avaliado por TaqMan Array Human Endogenous Controls Plate. A estabilidade dos genes foi determinada usando os algoritmos estatísticos geNorm, NormFinder, BestKeeper, delta-Ct comparativo e os dados foram compilados na ferramenta RefFinder. RefFinder explora esses programas computacionais para classificar e comparar genes de referência candidatos. Ele calcula a média geométrica dos pesos atribuídos pelos programas mencionados para a classificação final geral. Assim, entre os 32 genes avaliados, os 5 mais estáveis são respectivamente *CASC3*, *EIF2B1*, *UBC*, *RPS17* e *TFRC*. Os genes mais comumente utilizados nos estudos de endometriose para esse fim, como *GAPDH* e *ACTB*, foram classificados nas posições 20 e 28, respectivamente. O número ideal de genes de referência também foi calculado pelo geNorm, em que para essas amostras, é dois. Este é o primeiro trabalho a identificar genes de referência para amostras de eMSC de mulheres com e sem endometriose. Os genes *CASC3* e *EIF2B1* são os genes mais estáveis nas amostras estudadas e devem ser utilizados em conjunto como normalizadores. A identificação de genes de referência é essencial para direcionar futuros estudos de RT-qPCR.

Palavras-chave: endometriose; eMSC de fluxo menstrual; RT-qPCR; genes de referência estáveis.

ABSTRACT

It is suggested that menstrual endometrial mesenchymal stem cells (eMSC) has relationship with endometriosis. Currently, many gene expression studies are performed in the disease, searching for differentially expressed target genes. It is common to normalize RT-qPCR data using more stable reference genes. We proposed to evaluate the stability of 32 reference genes in eMSC from menstrual flow of women with and without endometriosis to direct future experiments. Endometriosis group (n=5): women with laparoscopic diagnosis of endometriosis. Control group (n=5): fertile patients submitted to laparoscopy for tubal ligation, without diagnosis of endometriosis. In both groups, the patients hadn't hormone therapy for 3 months before collection. The eMSC were isolated by plastic-adherent (P3), characterized by flow cytometry, and differentiated to adipocytes and osteoblasts. A total of 32 reference genes was evaluated by TaqMan Array Human Endogenous Controls Plate. Gene stability was determined using geNorm, NormFinder, BestKeeper, comparative delta-Ct statistical algorithms and data were compiled in RefFinder. RefFinder exploits these computational programs to rank and compare candidate reference genes. It calculates the geometric average of the weights attributed by the mentioned programs for the overall final ranking. Thus, among the 32 genes evaluated, the 5 most stable are respectively *CASC3*, *EIF2B1*, *UBC*, *RPS17* and *TFRC*. Genes commonly used in endometriosis studies for this purpose, such as *GAPDH* and *ACTB*, were classified at positions 20, and 28, respectively. The optimal number of reference genes also is calculated by geNorm, where for these samples it's two. This is the first work to identify reference genes for eMSC samples from women with and without endometriosis. The *CASC3* and *EIF2B1* genes are the most stable genes in the studied samples. Identifying reference genes is essential to direct future RT-qPCR studies.

Key-words: endometriosis; eMSC of menstrual flow; RT-qPCR; stable reference genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição dos valores de Ct dos 32 genes de referência candidatos.....	19
Figura 2 – Ranking RefFinder.....	21
Figura 3 – Ranking geNorm, NormFinder, BestKeeper e Delta-Ct.....	23
Figura 4 – Variação pareada geNorm.....	25

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	JUSTIFICATIVA	13
3.	OBJETIVO	14
4.	METODOLOGIA	15
4.1.	Características das pacientes.....	15
4.2.	Coleta das amostras e isolamento das eMSCs.....	15
4.3.	Isolamento do RNA e síntese do cDNA.....	16
4.4.	RT-qPCR.....	16
4.5.	Análise dos dados.....	18
5.	RESULTADOS	19
5.1.	Perfil de expressão dos genes de referência candidatos.....	19
5.2.	Análise da estabilidade dos genes de referência candidatos.....	20
5.3.	Determinação do número ótimo de genes de referência.....	24
6.	DISCUSSÃO	26
7.	CONCLUSÃO	30
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

Endometriose é uma doença caracterizada pela presença de tecido endometrial funcional, glandular e estromal fora da cavidade uterina que acomete mais frequentemente mulheres na idade reprodutiva (Zondervan et al., 2018). Clinicamente está associada mais comumente à dor pélvica persistente e infertilidade. Estima-se que mais de 176 milhões de mulheres sejam globalmente acometidas pela condição (Zondervan et al., 2002; Adamson et al., 2010), muitas das quais com reduzida qualidade de vida e comprometimento das suas relações sociais, profissionais e maritais. Além desse impacto na vida pessoal, a doença também é um fardo econômico significativo para a sociedade e o sistema de saúde (Soliman et al., 2019). A etiologia da endometriose ainda é desconhecida, existindo várias hipóteses relacionadas à origem e desenvolvimento das lesões ectópicas, tais como: a teoria dos restos embrionários, a qual defende que restos celulares de origem mulleriana poderiam sofrer uma diferenciação em tecido endometrial na presença de estrógeno (Russell, 1899); a teoria da metástase linfovascular, que sugere a disseminação de células endometriais para os locais ectópicos através da via linfática e hematogênica, representando a presença de endometriose no cérebro, pulmão, linfonodos, extremidades e parede abdominal (Sasson e Taylor, 2008); e a teoria da metaplasia celômica, que postula a transformação do epitélio celômico em tecido endometrial (Meyer, 1919). Atualmente, a explicação mais amplamente aceita para a origem da endometriose é a teoria de Sampson que considera o fluxo menstrual retrógrado de tecido endometrial para a cavidade peritoneal através das tubas uterinas (Sampson, 1927). Todavia, embora plausível, ela não explica todas as nuances da doença.

Recentemente foi descoberto que o endométrio, o fluxo menstrual e as lesões endometrióticas apresentam células com potencial progenitor (chamadas endometrial Mesenchymal Stem/Stromal Cells – eMSC) que podem estar diretamente relacionadas à gênese da doença (Cousins et al., 2018). Essa hipótese foi levantada por Prianishnikov, em 1978, sugerindo que células-tronco estavam presentes no endométrio, devido sua natureza altamente regenerativa.

O endométrio é formado por duas camadas estruturais: a funcional externa e a basal interna. É composto basicamente por dois tipos de células, as epiteliais (luminal e glandular) e as estromais, bem como células endoteliais e leucócitos (Kayisli et al. 2004; Spencer et al. 2005). Após a menstruação, o estágio proliferativo do endométrio começa sob a influência do aumento dos níveis circulantes de estrogênio. Este, por sua vez, é seguido pela fase secretora na qual os níveis de progesterona sobem à medida que o endométrio se prepara para a possibilidade de fertilização e implantação de um embrião. Se isso não ocorrer, então a camada

funcional e uma pequena porção do endométrio basal são eliminados (Maruyama et al. 2010). O fluxo menstrual e o tecido endometrial contêm uma população heterogênea de células, incluindo algumas com capacidade regenerativa. Postula-se que células-tronco adultas ou progenitoras sejam responsáveis pela regeneração cíclica endometrial, pois o endométrio está sujeito a mais de 400 ciclos de crescimento, diferenciação e descamação durante o período reprodutivo da mulher (Gargett e Masuda, 2010). Com base nisso, muitos estudos têm sido realizados na última década para identificar populações de CTs no tecido endometrial (Hufnagel et al., 2015).

O primeiro estudo que evidenciou a existência CTs endometriais foi em 2004, quando uma pequena porcentagem de células epiteliais (0,22%) e estromal (1,25%), estas chamadas de eMSC, demonstrou ter capacidade clonogênica (Chan et al, 2004). Outro estudo investigou os efeitos do ciclo menstrual nessas populações de CT da camada funcional, demonstrando que a frequência de células epiteliais e estromais clonogênicas não varia com as diferentes fases do ciclo menstrual ou no endométrio inativo. Como o endométrio inativo contém apenas uma camada basal e não um endométrio funcional, supõem-se então que um maior número de células progenitoras endometriais residam na camada basal e persistam além da menopausa. Além disso, este mesmo estudo considera que as células progenitoras descamadas no momento da menstruação, podem implantar e gerar endométrio em locais ectópicos (Schwab et al, 2005). Taylor em 2004 demonstrou que células endometriais podem ter origem de células derivadas da medula óssea, que estas células podem se diferenciar em endométrio uterino humano, sugerindo uma contribuição de células tronco extrauterinas na regeneração endometrial.

Recentes estudos têm buscado marcadores específicos para distinguir eMSCs da sua progênie madura. Tem sido mostrado que eMSCs possuem capacidade de coexpressar os marcadores CD140b (PDGFR β – platelet-derived growth factor receptor β) e CD146 (Schwab e Gargett, 2007), os quais são usados para isolar CTs mesenquimais (MSCs) em diversos tecidos (Crisan et al., 2008). Entretanto, mais recentemente, Masuda e colaboradores (2012) identificaram um novo marcador (SUSD2), específico para isolar células com habilidade de reconstituir tecido estromal endometrial in vivo. Em 2011, estudos revelaram que células com propriedades iguais às de eMSCs foram identificadas em lesões ectópicas, tanto em tecido fresco, como em cultura de células (Chan et al., 2011; Kao et al., 2011). Observou-se que as eMSC derivadas de cultura de células estromais ectópicas têm maior potencial proliferativo, migratório e invasivo que as células isoladas do endométrio eutópico dessas mesmas pacientes (Kao et al., 2011). Em endometrioma ovariano, tanto células estromais quanto epiteliais demonstraram capacidade de formação de colônias, autorrenovação in vitro e potencial de

diferenciação (Chan et al., 2011). Além disso, evidências sugerem que as eMSCs descamam preferencialmente em mulheres com endometriose (Leyendecker et al., 2002; Gargett, 2007).

Paralelamente à descoberta destas células, as metodologias de alto rendimento têm se desenvolvido rapidamente, permitindo grandes avanços na compreensão de inúmeros agravos. Um desses avanços diz respeito à análise da expressão gênica do endométrio eutópico e ectópico através de técnicas de sequenciamento e microarray, que tem auxiliado na identificação de vias e processos (*pathways*) envolvidos na fisiopatologia da endometriose (Meola et al., 2010). Esses métodos são confiáveis, mas apresentam algumas limitações. Um dos pontos críticos é a validação dos genes identificados. O método padrão-ouro para isso é a reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) (Koreza e Rapacz, 2013).

A RT-qPCR é um método robusto, reprodutível, com alta sensibilidade e especificidade, rápida detecção e capaz de identificar alvos em amostras de baixa concentração (Ginzinger, 2002; Hellemans e Vandesompele, 2014). Contudo, a confiabilidade das medidas de expressão gênica é fortemente afetada por fatores técnicos como, qualidade do template, eficiência da síntese da fita complementar de DNA (cDNA), performance dos primers e normalização dos dados (Nolan et al., 2006; Edmunds et al., 2014). Essa última, quando feita de forma imprópria, compromete as conclusões dos estudos (Liu et al., 2015; Andrusiewicz et al., 2016). De todas as possíveis formas de uniformização da quantificação da expressão gênica (Huggett et al., 2005), o uso de um ou mais genes de referência sem dúvida é a escolha mais comum (Hellemans e Vandesompele, 2014). Genes de referência (genes controles ou housekeeping) não devem variar em condições experimentais ou biológicas, contudo, muitos estudos usam estes genes constitutivos sem uma validação apropriada, pressupondo estabilidade de expressão (Vandesompele et al., 2002). Os genes controles classicamente escolhidos em estudos de expressão em mamíferos são *GAPDH*, *ACTB*, *B2M* e *HPRT* (Lee et al., 2002). Entretanto, estudos questionam a estabilidade destes controles em diferentes condições (Lee et al., 2002; Radonic et al., 2004) e a prática de uso de apenas um gene normalizador (Vandesompele et al., 2002).

2. JUSTIFICATIVA

A endometriose é uma doença de elevada prevalência populacional, acometendo cerca de 10% das mulheres em idade reprodutiva, sendo considerada um problema de saúde pública devido seu impacto na saúde física e psíquica das pacientes e também pelo impacto socioeconômico causado pelos custos para seu diagnóstico, tratamento e monitoramento. Se trata de uma doença multifatorial ginecológica benigna caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina, sendo de etiologia complexa. Até hoje, a Teoria de Sampson ou Menstruação Retrógrada é a mais aceita para explicar a doença. Estudos evidenciaram a presença de populações de células-tronco no endométrio, no fluxo menstrual e em lesões endometrióticas, sugerindo um provável papel destas células no desenvolvimento e progressão da doença.

Além disso, para entender a etiologia da doença, muitos estudos de alteração de expressão gênica estão sendo realizados. A técnica padrão-ouro para a quantificação da expressão gênica é a RT-qPCR, que é rápida, eficiente, precisa e reproduzível. A normalização da expressão geralmente é feita por genes de referência endógenos, os quais, por definição, são idealmente abundantes e com padrão de expressão estável nas diversas condições experimentais. Entretanto, esta condição não existe na prática. Dessa maneira, identificar genes de referência para normalização dos dados de expressão gênica é fundamental e é o primeiro passo para estudos envolvendo RT-qPCR.

Até o presente momento nenhum estudo avaliou a estabilidade de genes de referência para normalização da expressão gênica de dados de RT-qPCR em eMSC isoladas de fluxo menstrual de mulheres com e sem endometriose. Este inédito estudo direcionará a literatura quais e quantos genes são necessários para delinear posteriores estudos de quantificação do RNAm em eMSC de endométrio normal e endometriose.

3. OBJETIVO

Avaliar a estabilidade de 32 genes de referência e identificar os mais estáveis em eMSC de fluxo menstrual de mulheres com e sem endometriose.

4. METODOLOGIA

As eMSC de fluxo menstrual utilizadas neste trabalho foram previamente coletadas a este estudo no período de novembro de 2014 a dezembro de 2016 e fazem parte de um biorrepositório do Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa local (HCRP 15227/2012). O termo de consentimento informado foi obtido para todas as participantes incluídas.

4.1. *Características das pacientes*

As pacientes elegíveis (n=10; 5 endometriose e 5 controle) foram mulheres entre 18 e 40 anos, com índice de massa corporal (IMC) $\leq 35 \text{ Kg/m}^2$, com ciclos menstruais regulares (intervalos de 24 a 32 dias ± 3 dias; 2 a 7 dias de duração), sem uso de qualquer terapia hormonal há pelo menos 3 meses antes da coleta, e ausência de doenças sistêmicas tais como: *Diabetes mellitus* ou outras endocrinopatias, doença cardiovascular, lupus eritematoso sistêmico e outras doenças reumatológicas; não tinham hábitos tabagistas ou alcoólicos. Para o grupo de endometriose foram selecionadas 5 mulheres com idade média de 34,8 anos (SD $\pm 3,19$), com diagnóstico videolaparoscópico e histológico de endometriose estágio III ou IV segundo os critérios definidos pela ASRM (1997). Foram selecionadas apenas pacientes que haviam sido submetidas ao tratamento cirúrgico em média 4 anos (SD $\pm 1,3$) antes da coleta. Só foram incluídas pacientes que tinham diagnóstico de imagem sugestivo de endometrioma prévio à coleta, como indicativo de doença ativa. Como grupo controle foram selecionadas 5 mulheres férteis (com pelo menos 2 filhos), com idade média de 34,2 anos (SD $\pm 4,3$) sem história de aborto recorrente, sem diagnóstico clínico e videolaparoscópico de endometriose a no máximo 2 anos antes da coleta, que haviam sido submetidas à videolaparoscopia para laqueadura tubária.

4.2. *Coleta das amostras e isolamento das eMSCs*

O fluxo menstrual foi coletado com coletor menstrual de silicone (InCiclo, BR) do 2º ao 4º dia do ciclo. As eMSC foram isoladas do fluxo menstrual por densidade de gradiente e capacidade de aderência como previamente descrito por Meng et al., (2007). Para os experimentos foram usadas células de passagem 3 (*early culture*). As eMSC atendem os critérios mínimos da *International Society for Cellular Therapy* (Dominici et al., 2006). Assim, foram caracterizadas imunofenotipicamente para 23 marcadores, sendo: 1) expressão negativa ($\leq 2\%$) – CD45, CD14, CD31, CD34, CD106, STRO-1, HLA-DR e EpCAM; 2) baixa expressão (2-30%) –

CD51/CD61 e CD146; 3) expressão média (30-70%) – SUSD2, CD140b e CD166; 4) alta expressão ($\geq 70\%$) – HLA-ABC, CD44, CD49e, CD105, CD54, CD73, CD90, CD13 e CD29. Ainda, obedecendo aos critérios de caracterização foram diferenciadas em adipócitos e osteócitos segundo os protocolos descritos por Meng et al. (2007).

4.3. *Isolamento do RNA e síntese de cDNA*

O RNA total foi extraído das eMSC usando o Kit using Allprep DNA/RNA/miRNA Universal (#80224, Qiagen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade das amostras de RNA foi avaliada com o Kit Agilent RNA 6000 Nano (# 5067-1511, Agilent Technologies, USA) usando o Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). Apenas amostras com número de integridade do RNA (RIN) ≥ 7 foram incluídas no estudo. O RNA total foi quantificado com o Qubit RNABR Assay Kit (#Q10210, Invitrogen, USA) usando o Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA). Brevemente, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado com 1000 ng do RNA total usando o Kit High-Capacity RNA-to-cDNA (#4387406, Applied Biosystems, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA final produzido foi diluído 1:5 com água livre de nuclease e armazenado a -20°C até seu uso.

4.4. *RT-qPCR*

Os níveis de expressão dos 32 genes de referência candidatos foram avaliados usando a placa TaqMan Array Human Endogenous Controls Plate, Fast 96-well (#4426700, Applied Biosystems, USA) (todos os detalhes estão na Tabela 1). As amplificações RT-qPCR foram realizadas utilizando ViiA7 Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA). Cada reação foi preparada em um volume total de 10 μL contendo 5 μL de TaqMan Fast Advanced Master Mix (catalog number 4444557, Applied Biosystems, USA), 0,5 μL de sonda de hidrólise e 4,5 μL do cDNA diluído 1:5. Todas as amostras foram executadas em triplicate em placas de 96 poços de reação rápida. Os ciclos para a RT-qPCR foram os seguintes: 1 ciclo de 50°C por 2 minutos, 1 ciclo de 95°C por 20 segundos, 40 ciclos de 1 segundo em 95°C e 20 segundos em 60°C .

Tabela 1. Controles endógenos humanos TaqMan utilizados no estudo.

Gene ID	Nome do gene	Função (Gene Ontology)	Applied Biosystems ID
<i>18S</i>	RNA ribossômico 18S eucariótico	Tradução	Hs99999901_s1
<i>ABL1</i>	Homólogo do oncogene viral de leucemia murina Abelson V-abl 1	Atividade de proteína tirosina-quinase	Hs00245445_m1
<i>ACTB</i>	Beta-actina	Constituinte estrutural do citoesqueleto	Hs99999903_s1
<i>B2M</i>	Beta-2-Microglobulina	Ligação proteica	Hs99999907_m1
<i>CASC3</i>	Candidato a suscetibilidade ao câncer 3	Ligação ao RNA, complexo de junção do exon	Hs00201226_m1
<i>CDKN1A</i>	Inibidor da quinase dependente de ciclina (p21, Cip1)	Regulador do ciclo celular	Hs00355782_m1
<i>CDKN1B</i>	Inibidor 1B da quinase dependente de ciclina (p27, Kip1)	Regulador do ciclo celular	Hs00153277_m1
<i>EIF2B1</i>	Fator de iniciação da tradução eucariótica 2B, subunidade 1 alfa, 26 kDa	Iniciação traducional	Hs00426752_m1
<i>ELF1</i>	Fator E74-like 1 (fator de transcrição do domínio ets)	Regulação positiva da transcrição	Hs00152844_m1
<i>GADD45A</i>	Parada de crescimento e danos ao DNA alfa	Transdução de sinal em resposta a danos no DNA	Hs00169255_m1
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Glicólise, regulação da tradução	Hs99999905_m1
<i>GUSB</i>	Beta glucuronidase	Processo metabólico de carboidratos	Hs99999908_m1
<i>HMBS</i>	Hidroximetilbilano sinatse	Processo biossintético do grupamento heme	Hs00609297_m1
<i>HPRT1</i>	Hipoxantina fosforibosil transferase	Geração de nucleotídeos de purina	Hs99999909_m1
<i>IPO8</i>	Importina 8	Transporte intracelular de proteínas	Hs00183533_m1
<i>MRPL19</i>	Proteína ribossômica mitocondrial L19	Tradução	Hs00608519_m1
<i>MT-ATP6</i>	ATP sintase 6 codificada pela mitocôndria	Complexo ATP-sintase	Hs02596862_g1
<i>PES1</i>	Homólogo do Pescadillo 1, contend domínio BRCT (<i>zebra fish</i>)	Proliferação celular, processamento do RNAr	Hs00362795_g1
<i>PGK1</i>	Fosfoglicerato quinase	Glicólise, gliconeogênese	Hs99999906_m1
<i>POLR2A</i>	Poliptéideo A da RNA polimerase II (direcionado ao DNA)	Iniciação da transcrição	Hs00172178_m1
<i>POP4</i>	Processamento do precursor 4, subunidade P/MRP da ribonuclease (<i>S. cerevisiae</i>)	Processamento de RNAt, clivagem de RNAm	Hs00198357_m1
<i>PPIA</i>	Peptidilpropil isomerase A (ciclofilina A)	Dobramento de proteínas	Hs99999904_m1
<i>PSMC4</i>	Proteassoma (prosome, Macropain) subunidade 26S, ATPase, 4	Ligação de ATP, proteólise	Hs00197826_m1
<i>PUM1</i>	Homólogo Pumilio 1 (<i>Drosophila</i>)	Regulamento de tradução	Hs00206469_m1
<i>RPL30</i>	Proteína ribossomal L30	Tradução	Hs00265497_m1
<i>RPL37A</i>	Proteína ribossomal L37a	Tradução	Hs01102345_m1

<i>RPLP0</i>	Proteína ribossomal, grande, P0	Tradução	Hs99999902_m1
<i>RPS17</i>	Proteína ribossomal S17	Constituinte estrutural do ribossomo	Hs00734303_g1
<i>TBP</i>	Proteína de ligação a TATA box	Ligação ao fator de transcrição	Hs99999910_m1
<i>TFRC</i>	Receptor de transferrina (P90, CD71)	Transporte de transferrina	Hs99999911_m1
<i>UBC</i>	Ubiquitina C	Ligação a protease, transporte endossômico	Hs00824723_m1
<i>YWHAZ</i>	Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase, polipeptídeo zeta	Transdução de sinal	Hs00237047_m1

4.5. Análise dos dados

A estabilidade dos genes de referência candidatos foi avaliada utilizando os valores médios dos Ct (cycle threshold) das três réplicas técnicas para cada amostra aplicando uma ferramenta abrangente, o RefFinder (Xie et al., 2012), o qual inclui quatro algoritmos estatísticos:

- 1) o geNorm avalia o valor de estabilidade da expressão (M) para cada gene de referência baseado na variação pareada média entre os genes candidatos, onde menores valores de M indicam maior estabilidade, sendo recomendado pelo geNorm valores abaixo do limite padrão de $M = 1,5$. Além disso, o algoritmo estatístico identifica o número ótimo de genes necessários para uma normalização mais precisa baseada na variação pareada (V_n/V_{n+1}), no qual o valor de cut-off sugerido é 0,15 (Vandermompele et al., 2002);
- 2) o NormFinder classifica os genes candidatos de acordo com o cálculo do valor de estabilidade (SV) baseado na variação intra e intergrupos (Andersen et al., 2004);
- 3) o BestKeeper calcula a estabilidade dos candidatos baseado desvio padrão (SD) de seus valores de Ct, além do coeficiente de variância (CV), coeficiente de correlação (r) e p-value (p) (Pfaffl et al., 2004);
- 4) o método comparativo delta Ct calcula a expressão relativa entre o gene candidato e outros genes dentro da própria amostra e ranqueia baseado na reprodutibilidade de variação da expressão entre as amostras do estudo (Silver et al., 2006).

O RefFinder fornece a classificação abrangente recomendada por calcular a média geométrica a partir das ordens de classificação resultantes dos quatro algoritmos supracitados. Estas análises foram feitas com os dados de ambos os grupos (controle + endometriose) e para os grupos separadamente.

5. RESULTADOS

5.1. Perfil de expressão dos genes de referência candidatos

A distribuição dos valores de Ct dos 32 genes de referência candidatos para ambos os grupos está representada na figura 1. A estatística descritiva dos valores de Ct mostra um comportamento biológico variável destes genes, sendo o 18S mais abundante (Ct entre 9,505 e 14,253) e o *YWHAZ* menos expresso (Ct entre 27,553 e 30,389). Mais de 50% dos genes estão na faixa de Ct de 20 a 25. Sendo o gene *GADD45A* com maior amplitude, representado uma grande dispersão intragrupo.

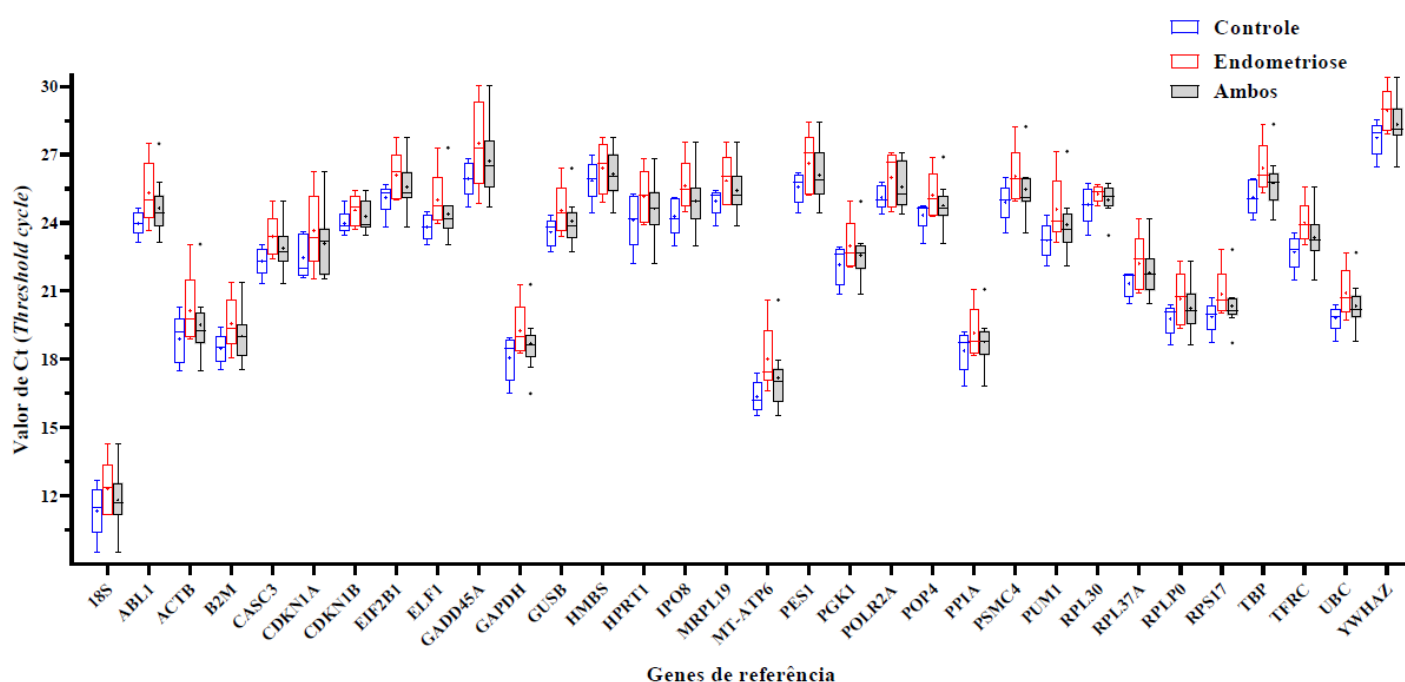
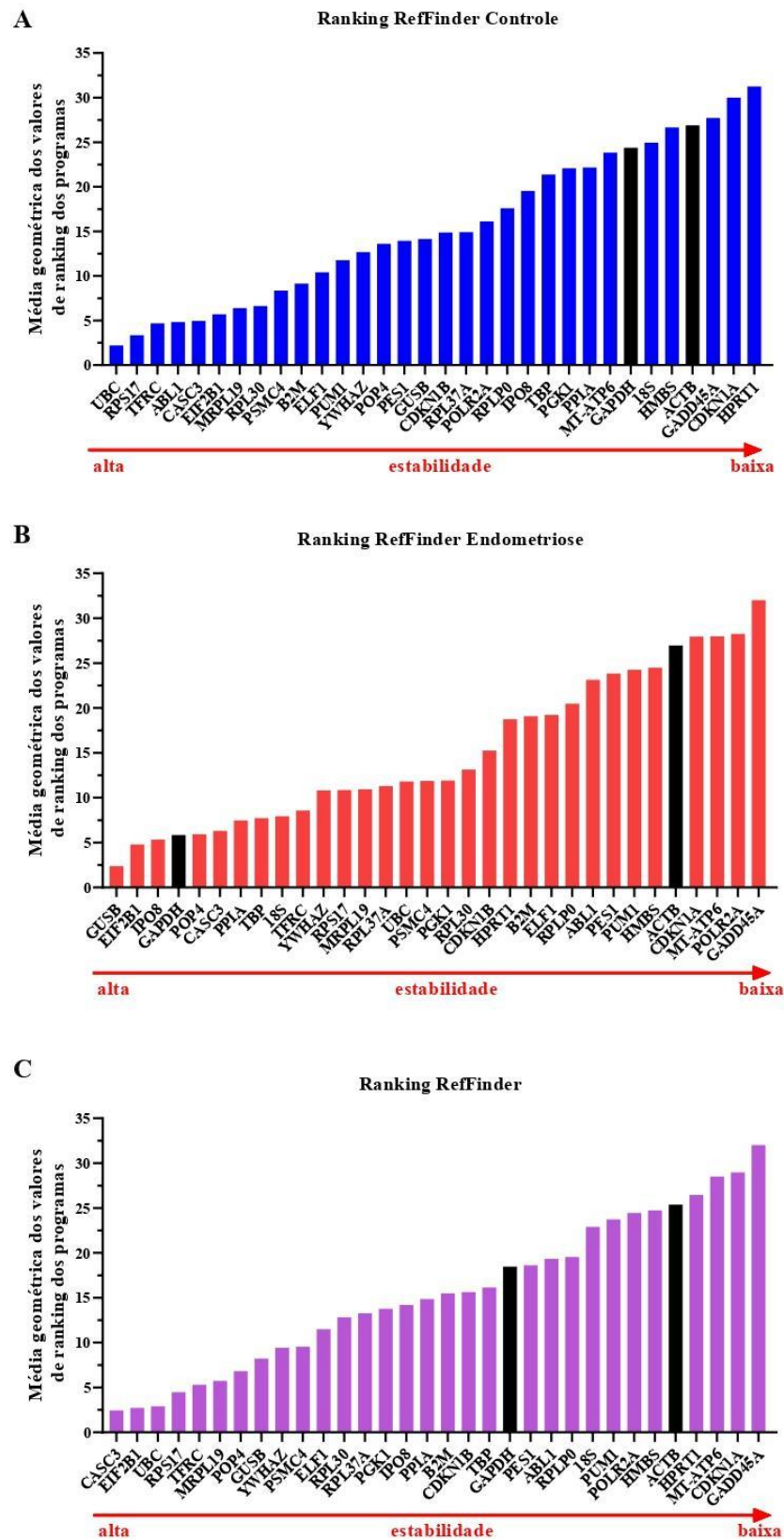


Figura 1. Distribuição dos valores de Ct dos 32 genes de referência candidatos para os grupos controle e endometriose separadamente e para os grupos combinados.

5.2. Análise da estabilidade dos genes de referência candidatos

Afim de definir os melhores genes de referência normalizadores para RT-qPCR em eMSC obtidas de mulheres com e sem endometriose, o Ct de 32 genes conhecidos como constitutivos foi avaliado pela ferramenta disponível na web chamada RefFinder. Os três genes mais estáveis para o grupo controle são *UBC* > *RPS17* > *TFRC* (Figura 2A), para o grupo endometriose são *GUSB* > *EIF2B1* > *IPO8* (Figura 2B) e para a avaliação das duas amostras conjuntamente, os três mais estáveis são *CASC3* > *EIF2B1* > *UBC* (Figura 2C). Também pode ser observado na figura 2 (barra preta) que os genes *GAPDH* e *ACTB* (genes mais utilizados nos estudos como normalizadores) estão nas posições respectivamente 20° e 28° para ambos os grupos, 26° e 29° para controle e 4° e 28° para o grupo endometriose, mostrando um possível impacto biológico variável do *GAPDH* para a endometriose.

Figura 2. Ranking feito pelo algoritmo estatístico RefFinder de acordo com a média geométrica dos valores dos outros programas para o grupo controle (A), o grupo endometriose (B) e os grupos combinados (C).



Estes resultados apresentados acima são os dados compilados dos algoritmos estatísticos geNorm, NormFinder, BestKeeper e delta-Ct comparativo. Os resultados de classificação dos genes para os grupos controle e endometriose avaliados simultaneamente e obtidos de cada um dos programas individualmente estão apresentados na figura 3A-D (os dados de cada grupo separadamente estão na Tabela 2).

geNorm. O geNorm avaliou os genes com base no valor de M (estabilidade da expressão), sendo que todos os genes avaliados apresentaram $M < 0,6$ (cut-off $M < 1,5$), os genes *CASC3* = *TFRC* ($M = 0,178$) foram considerados altamente estáveis pelo programa (cut-off $M \leq 0,2$) (Figura 3A). Para o grupo controle os mais estáveis são os genes *RPL30* = *TFRC* ($M = 0,112$) e para o grupo endometriose os genes *GAPDH* = *PPIA* ($M = 0,086$) (Tabela 2).

NormFinder. Pelo NormFinder os genes *EIF2B1*>*UBC*>*CASC3* são mais estáveis para ambos os grupos (Figura 3B). Os genes *EIF2B1*>*ABL1* foram os dois mais estáveis para o grupo controle e os genes *GUSB*>*EIF2B1* para o grupo endometriose (Tabela 2).

BestKeeper. O algoritmo BestKeeper ordenou os genes pelo desvio padrão (SD) sendo que, quanto menor o SD mais estável é o gene. Os três mais estáveis para os grupos combinados foram *RPL30*>*CDKN1B*>*POP4* (Figura 3C). Para o grupo controle, os dois genes com menor SD foram *ABL1*>*CDKN1B* e para o grupo endometriose os genes *RPL30*>*CDKN1B* (Tabela 2).

Método comparativo delta-Ct. Pelo método do delta-Ct os três genes mais estáveis são *EIF2B1*>*UBC*>*CASC3* na análise simultânea dos grupos (Figura 3D). Para o grupo controle, os genes *UBC*>*RPS17* foram os dois mais estáveis e para o grupo endometriose os genes *GUSB*>*EIF2B1* (Tabela 2).

Figura 3. Ranking oferecido para os grupos combinados de acordo com os algoritmos estatísticos individualmente: geNorm (A), NormFinder (B), BestKeeper (C) e Delta-Ct (D).

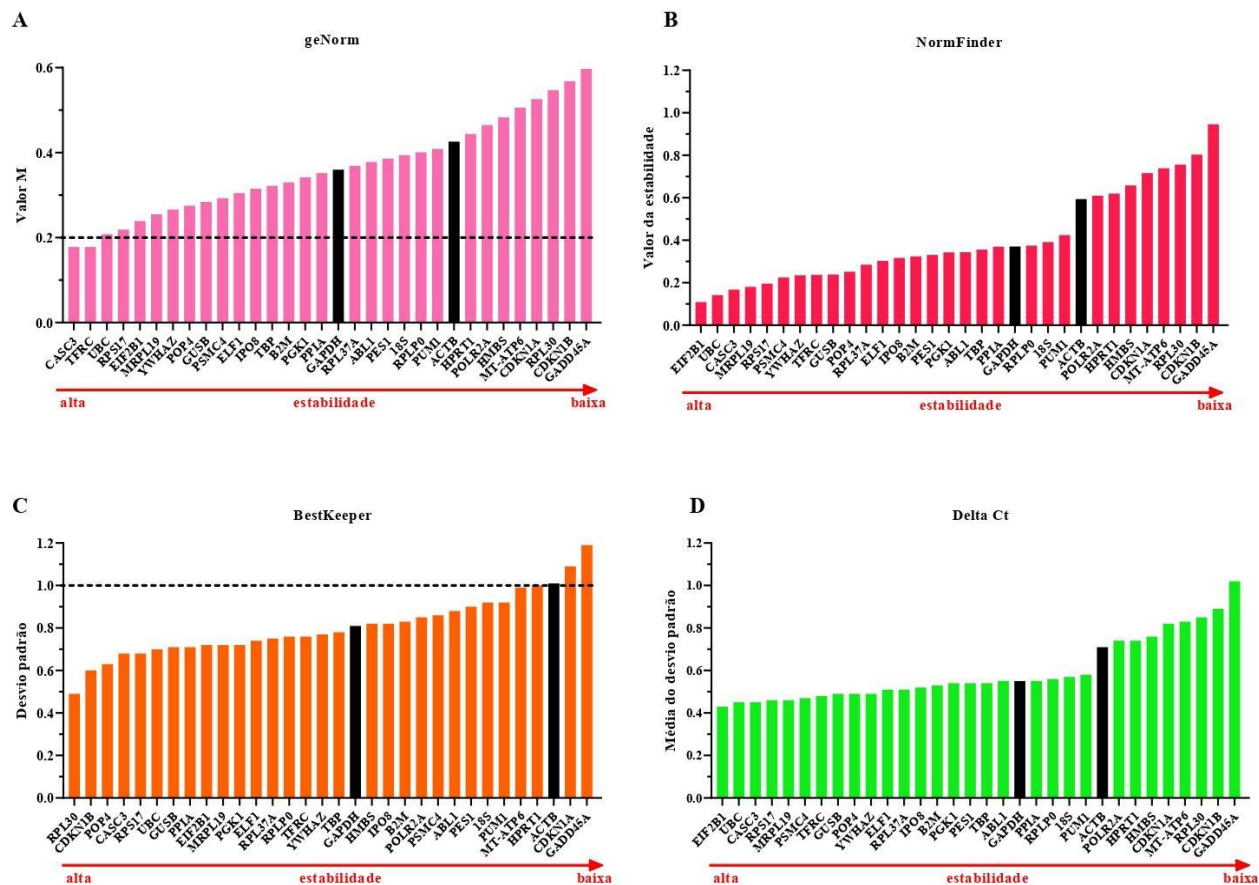


Tabela 2. Ranking de estabilidade dos 32 genes de referência analisados pelos cinco algoritmos nos grupos experimentais.

Gene	ReffFinder (Geomean of ranking values)		Delta Ct (Average of STDEV)		BestKeeper (SD)		NormFinder (Stability value)		geNorm (M-value)	
	Control	Endometriosis	Control	Endometriosis	Control	Endometriosis	Control	Endometriosis	Control	Endometriosis
<i>18S</i>	24.940	7.930	0.680	0.430	0.800	0.900	0.557	0.165	0.419	0.255
<i>ABL1</i>	4.820	23.140	0.460	0.580	0.380*	1.050	0.191*	0.414	0.259	0.354
<i>ACTB</i>	26.900	26.950	0.720	0.730	0.870	1.170	0.616	0.625	0.434	0.410
<i>B2M</i>	9.150	19.070	0.480	0.580	0.480	0.820	0.266	0.407	0.215	0.339
<i>CASC3</i>	4.950	6.310	0.440	0.450	0.430	0.630	0.157	0.201	0.187	0.193
<i>CDKN1A</i>	30.000	27.950	0.900	0.790	0.830	1.240	0.817	0.690	0.539	0.435
<i>CDKN1B</i>	14.860	15.240	0.820	0.950	0.390*	0.580*	0.723	0.880	0.514	0.510
<i>EIF2B1</i>	5.700	4.790*	0.440	0.420*	0.510	0.820	0.112*	0.111*	0.243	0.248
<i>ELF1</i>	10.400	19.220	0.500	0.510	0.430	0.930	0.299	0.331	0.266	0.284
<i>GADD45A</i>	27.710	32.000	0.990	1.070	0.550	1.470	0.917	1.010	0.591	0.577
<i>GAPDH</i>	24.370	5.850	0.630	0.450	0.810	0.850	0.503	0.218	0.403	0.086*
<i>GUSB</i>	14.140	2.380*	0.520	0.410*	0.510	0.800	0.334	0.106*	0.273	0.122
<i>HMBS</i>	26.660	24.480	0.780	0.690	0.600	0.950	0.670	0.585	0.492	0.390
<i>HPRT1</i>	31.250	18.730	0.950	0.490	0.900	0.920	0.880	0.303	0.564	0.293
<i>IPO8</i>	19.530	5.330	0.550	0.480	0.630	0.810	0.392	0.126	0.325	0.229
<i>MRPL19</i>	6.400	10.930	0.450	0.450	0.440	0.870	0.146	0.203	0.252	0.266
<i>MT-ATP6</i>	23.830	27.970	0.760	0.830	0.550	1.030	0.651	0.744	0.454	0.457
<i>PES1</i>	13.940	23.820	0.500	0.580	0.540	1.110	0.270	0.418	0.301	0.322
<i>PGK1</i>	22.080	11.920	0.580	0.460	0.730	0.830	0.423	0.218	0.389	0.236
<i>POLR2A</i>	16.120	28.250	0.710	0.800	0.410	1.070	0.584	0.691	0.472	0.480
<i>POP4</i>	13.610	5.920	0.500	0.440	0.490	0.790	0.278	0.202	0.312	0.158
<i>PPIA</i>	22.150	7.470	0.590	0.460	0.700	0.860	0.439	0.239	0.378	0.086*
<i>PSMC4</i>	8.350	11.860	0.480	0.450	0.570	0.880	0.253	0.216	0.135	0.242
<i>PUM1</i>	11.760	24.250	0.490	0.630	0.560	1.030	0.290	0.508	0.202	0.371
<i>RPL30</i>	6.630	13.140	0.480	1.060	0.580	0.280*	0.266	1.002	0.112*	0.544
<i>RPL37A</i>	14.910	11.300	0.550	0.450	0.480	0.960	0.363	0.181	0.352	0.276
<i>RPLP0</i>	17.590	20.480	0.560	0.550	0.510	0.930	0.377	0.396	0.365	0.306
<i>RPS17</i>	3.360*	10.850	0.430*	0.470	0.470	0.780	0.089	0.280	0.157	0.221
<i>TBP</i>	21.380	7.730	0.600	0.450	0.620	0.820	0.459	0.217	0.338	0.103
<i>TFRC</i>	4.680	8.560	0.440	0.470	0.540	0.630	0.170	0.248	0.112*	0.210
<i>UBC</i>	2.210*	11.810	0.420*	0.460	0.400	0.800	0.021	0.212	0.231	0.271
<i>YWHAZ</i>	12.680	10.820	0.490	0.460	0.580	0.730	0.247	0.229	0.286	0.261

* representa os dois genes de referência candidatos mais estáveis por grupo, baseado nos rankings de cada programa computacional.

5.3. Determinação do número ótimo de genes de referência

Um número ótimo de dois genes de referência apenas é necessário como normalizadores nesta situação experimental onde são analisadas eMSC da condição com e sem endometriose, ou mesmo quando os grupos são avaliados separadamente (Figura 4). Este número de genes foi determinado por um V escore abaixo de 0.15 no software geNorm quando comparando o fator de normalização baseado no 2º ou 3º genes mais estáveis.

6. DISCUSSÃO

A endometriose é uma doença crônica, inflamatória, com uma alta incidência e graves consequências reprodutivas e para a saúde em um modo geral (Czyzyk, et al., 2017). Doença pouco compreendida, a hipótese da menstruação retrógrada de Sampson não consegue explicar todos os enigmas da endometriose (Koninckx et al., 2018). Em 2004, foi descoberta a existência de células-tronco endometriais (Chan et al., 2004), desencadeando inúmeros estudos sobre a participação destas na etiopatogenia da doença, porém, nenhuma evidência direta da função destas células ainda foi relatada (Gargett, et al., 2016). Propuseram que eMSCs sejam eliminadas anormalmente durante a menstruação, estabelecendo implantes ectópicos causando endometriose (Sasson e Taylor, 2008, Gargett e Masuda, 2010), ou que lesões endometrióticas iniciadas por eMSCs seriam mais graves e invasivas (Gargett, 2007), ou que estas eMSCs apresentam anormalidades propiciando a implantação e estabelecimento da doença (Nyholt et al., 2012).

Além disso, estudos sobre a genética da endometriose têm sido crescente, uma revisão destacou fortes participações de mecanismos genéticos e epigenéticos no desenvolvimento da doença (Burney R.O., 2013). Atualmente, muitos estudos envolvendo *screening* e microarray de eMSCs estão sendo feitos, afim de buscar um gene alvo diferencialmente expresso, que possa ter impacto na endometriose (Fettback et al., 2015; Krjutskov et al., 2016; Warren et al., 2018). Esses tipos de estudo envolvem diretamente a quantificação da expressão gênica, sendo que a técnica mais comum e considerada padrão-ouro para analisar o nível de expressão manifestada por diferentes genes, é a transcrição reversa, seguida pela reação quantitativa em cadeia da polimerase (RT-qPCR) (Andrusiewicz et al., 2016). Entretanto, sua confiabilidade depende de fatores como integridade e quantidade do RNA, transcrição reversa precisa, eficiência do primer e, principalmente, a escolha apropriada do gene de referência (Nolan et al., 2006; Bustin et al., 2009).

A normalização feita pelos genes de referência é fundamental para corrigir variáveis experimentais, tais como: atividade enzimática, quantidade de material de início e diferenças entre a expressão de diferentes condições (Vandesompele et al., 2002). Dessa maneira, os genes de referência utilizados devem ter expressão abundante e alta estabilidade (Stocker et al., 2017). Este é um estudo pioneiro, pois na literatura não existem estudos que avaliam a estabilidade de 32 genes de referência em células mesenquimais endometriais isoladas de fluxo menstrual de mulheres com e sem endometriose. No presente estudo, as eMSCs apresentaram valores de Ct dos genes de referência candidatos entre 9,505 e 30,389, com o *18S* sendo o gene com maior

expressão e o gene *YWHAZ* com menor expressão. *18S* é um componente do RNA ribossomal enquanto o *YWHAZ* é transcrito em RNAm, dessa maneira, é esperado que o *18S* apresente alta expressão. No entanto, a escolha do *18S* como normalizador deve ser cautelosa uma vez que a proporção de RNA ribossomal para RNAm é muito alta, podendo ser muitas vezes incomparável a alvos gênicos com menores expressões, sendo assim, pode levar à falsas interpretações quando são escolhidos como normalizadores (Ayakannu et al., 2015).

Para avaliar a estabilidade dos genes, consideramos o software *online* RefFinder como o norteador dos resultados, uma vez que tem a função de compilar os resultados dos outros algoritmos estatísticos. Observou-se que os genes de referência mais estáveis para as amostras de eMSC menstruais de mulheres saudáveis e com endometriose foram *CASC3* e *EIF2B1*, respectivamente. Ainda, geNorm constatou que o número ótimo de genes de referência a serem utilizados para estas amostras são dois. É importante salientar que, considerando os grupos separadamente, os genes mais estáveis são diferentes: para o grupo controle, *UBC* e *RPS17* e para o grupo endometriose, *GUSB* e *EIF2B1*.

O gene *CASC3* codifica um componente central do complexo de junção do éxon (Gerbracht et al., 2019). Já o gene *EIF2B1* codifica uma das cinco subunidades do fator de iniciação de tradução eucariótica 2B, que é um fator de troca de GTP e regulador da síntese proteica (Wortham; Proud, 2015). De acordo com estudos de RNA-seq, os genes apresentam uma expressão ubíqua no endométrio (Fagerberg et al., 2014). Portanto, é esperado que sejam genes mais estáveis nas amostras de eMSC pelas suas funções constitutivas, mesmo quando a análise é feita em pacientes com endometriose, mostrando que, provavelmente, estes genes não possuem sua expressão afetada pela doença.

Os genes *GAPDH* e *ACTB* são os escolhidos como genes de referência mais comumente utilizados em estudos de endometriose (Gebeh et al., 2012; Lee et al., 2012). Entretanto, a partir dos nossos resultados, é possível visualizar que ambos apresentam ampla variabilidade quando a análise é feita com os grupos controle e endometriose combinados. O *GAPDH* e o *ACTB* estão nas posições 20 e 28, respectivamente, pela classificação apresentada pelo RefFinder.

Até o momento, existe apenas um trabalho que avaliou a estabilidade da expressão de genes de referência candidatos em endométrio e lesões de endometriose. Audrusiewicz e colaboradores, em 2016, evidenciou que, para ambos os tecidos (lesão e endométrio), um mínimo de dois genes de referência pode ser utilizado, sendo os mais estáveis o *PPIA* (peptidilprolil isomerase A) e *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). Contudo, o estudo mostra que em uma análise

de estabilidade apenas do endométrio de mulheres saudáveis, o *GAPDH* não é a melhor escolha, corroborando com os resultados do presente estudo. Embora sejam amostras diferentes, as eMSCs tem origem endometrial e podem ter sua expressão gênica influenciada pelos tecidos onde estão abrigadas.

Além disso, foi identificado que a combinação dos genes *MRPL19* (proteína ribossomal mitocondrial L19), *PPIA* (peptidilprolil isomerase A) e *IPO8* (importina 8) é a mais adequada para normalização de quantificação da expressão em carcinoma endometrial, a partir de uma análise das mesmas placas utilizadas para nossa análise (Ayakannu et al., 2015). Genes de referência mais estáveis também foram identificados em linhagens 3D de células mesenquimais estromais derivadas da medula óssea, em que se recomenda a combinação dos genes *TBP* (proteína de ligação a TATA-box), *TFRC* (receptor de transferrina) e *HPRT1* (hipoxantina fosforibosiltransferase 1) para normalização dos dados (Rauh et al., 2015). Esses achados mostram que para cada tecido e condição experimental há uma variabilidade muito grande na expressão de genes, e, portanto, existem distintos genes de referência mais estáveis para as diferentes situações. Assim, evidencia-se a importância da identificação desses genes para normalização dos dados de RT-qPCR.

Este estudo inédito poderá direcionar a crescente literatura que envolve estudos de expressão gênica em células-tronco mesenquimais endometriais de mulheres com e sem endometriose, uma vez que a real função destas células na etiopatogenia da doença ainda é incerta e a maioria dos trabalhos que apresentam genes alvos para a doença são contraditórios.

A principal limitação deste estudo é o fato de que estas células não representam o real ambiente molecular regulatório celular, uma vez que foram analisadas após cultivo celular, o que dificulta extrapolar estes achados para sistemas *in vivo*. Contudo, esse trabalho direciona a maioria dos estudos que fazem uso destas células, pois estudos *in vitro* são ainda a maior escolha para pesquisa neste campo de investigação. Outro ponto a ser considerado é o pequeno número amostral, devido aos critérios restritivos de elegibilidade adotados, embora amostras homogenias são melhores fontes para destacar efeitos biológicos.

7. CONCLUSÃO

Este é o primeiro trabalho que identifica genes de referência para amostras de eMSC de mulheres com e sem endometriose. Recomenda-se um número mínimo de dois genes de referência, sendo *CASC3* e *EIF2B1* os genes de maior estabilidade nas amostras estudadas. Identificar genes de referência é fundamental para direcionar futuros estudos de RT-qPCR.

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

A inclusão deste trabalho foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 57ª Sessão Ordinária, realizada em 04/10/2021.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. **Fertil Steril.**, v. 67, p. 817-821, 1997.
- ADAMSON, G. et al. Creating solutions in endometriosis: global collaboration through the World Endometriosis Research Foundation. **J. Endometr. Pelvic Pain Disord.** V. 2, p. 3-6, 2010.
- ANDERSEN, C. et al. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res.**, v. 64, p. 5245-5250, 2004.
- ANDRUSIEWICZ, M. et al. Selection of reliable reference genes in eutopic and ectopic endometrium for quantitative expression studies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 78, p. 66–73, 2016.
- AYAKANNU, T. et al. Validation of endogenous control reference genes for normalizing gene expression studies in endometrial carcinoma. **Molecular Human Reproduction**, v. 21, n. 9, p. 723–735, 2015.
- BENAGIANO, G. et al. The History of Endometriosis. **Gynecol Obstet Invest**, v. 78, p. 1-9, 2014.
- BURNEY, R. The genetics and biochemistry of endometriosis. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 25, p. 280-286, 2013.
- BUSTIN, S. et al. The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin. Chem.**, v. 55, p. 611-622, 2009.
- CHAN, R. et al. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. **Biol Reprod**, v. 70, p. 1738–1750, 2004.
- CHAN, R. et al. Identification of cells with colony-forming activity, self-renewal capacity, and multipotency in ovarian endometriosis. **Am J Pathol**, v. 178, p. 2832–2844, 2011.
- COUSINS, F. et al. Endometrial stem/progenitor cells and their role in the pathogenesis of endometriosis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 50, p. 27-38, 2018.
- CRISAN, M. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell Stem Cell**, v. 3, p. 301–313, 2008.
- CZYZYK, A. et al. Update on endometriosis pathogenesis. **Minerva Ginecol**, v. 69, p. 447-461, 2017.
- EDMUNDS, R. et al. Toward enhanced MIQE compliance: reference residual normalization of qPCR gene expression data. **J Biomol Tech**, v. 25, p. 54-60, 2014.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317, 2006.
- FAGERBERG, L. et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. **Mol Cell Proteomics**, v. 13, p. 397-406, 2013.

- FETTBACK, P. et al. Expression of stem cell-related genes in the endometrium and endometriotic lesions: a pilot study. **Gynecol Endocrinol**, v. 32, n. 1, p. 82-86, 2016.
- GARGETT, C; MASUDA H. Adult stem cells in the endometrium. **Mol Hum Reprod**, v. 16, p. 818-834, 2010.
- GARGETT, C. et al. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. **Human reproduction update**, v. 22, p. 137-163, 2016.
- GARGETT, C. Uterine stem cells: what is the evidence? **Hum. Reprod**, v. 13, p. 87–101, 2007.
- GEBEH, A. et al. Variation in stability of endogenous reference genes in fallopian tubes and endometrium from healthy and ectopic pregnant women. **Int J Mol Sci**, v. 13, p. 2810-2826, 2012.
- GERBRACHT, J. et al. CASC3 promotes transcriptome-wide activation of nonsense-mediated decay by the exon junction complex. **BioRxiv** (ainda não publicado).
- GINZIGER, D. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Exp. Hematol.**, v. 30, p. 503-512, 2002.
- HELLEMANS, J.; VANDESOMPELE, J. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis. **Methods in Molecular Biology**, v. 1160, p. 19–26, 2014.
- HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes Immun**, v. 6, p. 279-284, 2005.
- KAO, L. et al. Expression Profiling of Endometrium from Women with Endometriosis Reveals Candidate Genes for Disease-Based Implantation Failure and Infertility. **Endocrinol**, v. 144, p. 2870-2881, 2003.
- KAYISLI, U. et al. Endocrine-immune interactions in human endometrium. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1034, p. 50– 63, 2004.
- KONINCKX, P. et al. Pathogenesis of endometriosis: the genetic/epigenetic theory. **Fertil Steril**, v. 111, p. 327-340, 2018.
- KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **J Appl Genet**, v. 54, p. 391-406, 2013.
- KRJUTŠKOV, K. et al. Single-cell transcriptome analysis of endometrial tissue. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 31, 4, p. 844-53, 2016.
- LEE, P. et al. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. **Genome Res.**, v. 12, n. 2, p. 292-297, 2002.
- LEYENDECKER, G. et al. Endometriosis results from the dislocation of basal endometrium. **Hum. Reprod**, v. 17, p. 2725–2736, 2002.
- LIU, L. et al. Identification of valid reference genes for the normalization of RT-qPCR expression studies in human breast cancer cell lines treated with and without transient transfection. **PLoS One**, v. 10, n. 1, 2015.
- MARUYAMA, T. et al. Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology. **Reproduction**, v. 140 p. 11–22, 2010.
- MASUDA, H. et al. A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells. **Cell Transplant**, v. 21, p. 2201–2214, 2012.

- MENG, X. et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. **J. Transl Med.**, v. 15, n. 5, 2007.
- MEOLA, J. et al. Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 93, p. 1750-1773, 2010.
- NOLAN, T. et al. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nat Protoc**, v. 1, p. 1559-1582, 2006.
- NYHOLT, D. et al. Genome-wide association meta-analysis identifies new endometriosis risk loci. **Nat Genet**, v. 44, p. 1355-1359, 2012.
- PFAFFL, M. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol Lett**, v. 26, p. 509-515, 2004.
- RADONIC, A. et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 313, n. 4, p. 856-862, 2004.
- RAUH, J.; JACOBI, A.; STIEHLER, M. Identification of stable reference genes for gene expression analysis of three-dimensional cultivated human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 21, n. 2, p. 192–206, 2015.
- SAMPSON, J. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. **Am J Obstet Gynecol**, v. 14, p. 422-429, 1927.
- SASSON, I. et al. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1127, p. 106-115, 2008.
- SCHWAB, K.; GARRGET, C. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. **Human Reproduction**, v. 22, p. 2903–2911, 2007.
- SCHWAB, K. et al. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. **Fertil Steril**, v. 84, p. 1124–1130, 2005.
- SILVER, N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Mol Biol**, v. 6, p. 33, 2006.
- SOLIMANM A. et al. Health Care Utilization and Costs Associated with Endometriosis Among Women with Medicaid Insurance. **Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy**, v. 25, p. 566-572, 2019.
- SPENCER, T. et al. Comparative developmental biology of the mammalian uterus. **Curr. Top. Dev. Biol.** v. 68, p. 85–122, 2005.
- STOCKER, L. et al. Identifying stably expressed housekeeping genes in the endometrium of fertile women, women with recurrent implantation failure and recurrent miscarriages. **Scientific reports**, v. 7, p. 148-157, 2017.
- TAYLOR, H. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. **Journal of the American Medical Association**, v. 292, p. 81–85, 2004.
- THANGESWERAN, A. et al. Validation of endogenous control reference genes for normalizing gene expression studies in endometrial carcinoma. **Molecular Human Reproduction**, v. 21, n. 9, p. 723–735, 2015.

- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.**, v. 3, n. 8, 2002.
- WARREN, L. et al. Analysis of menstrual effluent: diagnostic potential for endometriosis. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 24,1 1. 2018.
- WHORTHAM, N.; PROUD, C. eIF2B: recent structural and functional insights into a key regulator of translation. **Biochemical Society Transactions**, v. 43, p. 1234-1240, 2015.
- XIE, F. et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Mol Biol**, v. 80, p. 75-84, 2012.
- ZONDERVAN, K. et al. Endometriosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, 2018.
- ZONDERVAN, K. et al. What makes a good case-control study? **Human Reproduction**, v. 17, p. 1415-1423, 2002.