

Helena Malvezzi

**LOCALIZAÇÃO DE CÉLULAS SENESCENTES NAS LESÕES DE
PACIENTES COM ENDOMETRIOSE PROFUNDA**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde.

São Paulo

2022

Helena Malvezzi

**LOCALIZAÇÃO DE CÉLULAS SENESCENTES NAS LESÕES DE
PACIENTES COM ENDOMETRIOSE PROFUNDA**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Podgaec

Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Meola
Lovato

São Paulo

2022

Malvezzi, Helena

Localização de células senescentes nas lesões de pacientes com endometriose profunda / Helena Malvezzi. -- São Paulo, 2022.

xvi, 99 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Senescent cells co-localization in lesions of patients with deep endometriosis.*

1. Endométrio. 2. Senescência celular. 3. Estresse oxidativo. 4. Inflamação.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Helena Malvezzi

**LOCALIZAÇÃO DE CÉLULAS SENESCENTES NAS LESÕES DE
PACIENTES COM ENDOMETRIOSE PROFUNDA**

Presidente da banca: Prof. Dr. Sérgio Podgaec

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Bianca Alves Vieira Bianco

Profa. Dra. Eliane Antonioli

Prof. Dr. Paulo Augusto Ayroza Galvão Ribeiro

Membros suplementes:

Dra. Raquel de Melo Alves Paiva

Dr. João Antônio Dias Junior

Aprovada em: 09/05/2022.

Dedicatória

À Alice, aquela que me faz enxergar a vida com outros olhos e ao Jomil, meu companheiro que divide esse olhar comigo.

Agradecimentos

Agradeço a oportunidade de desfrutar a vida, acolhida por quem me quer bem, estando em constante aprendizado. Às minhas avós Maria e Anna (sempre em oração comigo). À minha família (filha, companheiro, pais, irmãs, irmão, sobrinhas e sobrinhos), base do que acredito e fonte de inspiração.

Ao meu orientador e mentor Prof. Dr. Sérgio Podgaec, que acredita, aposta e incentiva o desenvolvimento do meu potencial. À Dra. Carla Piccinato e Prof. Dra. Juliana Meola que me ajudaram a compreender o meu trabalho, meu papel na pesquisa e a focar as minhas energias no que era preciso. À equipe de pesquisa, Laura Palmieri, Dra. Camila Hernandez e Dra. Bruna Cestari pela ajuda durante o todo o doutorado.

À todos que trabalham no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa e aos colaboradores do Laboratório de Pesquisa Experimental. A Comissão de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein pela oportunidade de desenvolver meu doutorado neste setor. Ao Núcleo de Apoio aos Pesquisadores e à Biblioteca pela assistência. À equipe de estatística, em especial à Elivane da Silva Victor. Aos docentes de Pós-graduação, pelos ensinamentos.

Aos médicos, enfermeiras e auxiliares do centro cirúrgico que me ajudaram na coleta do material. Em especial à Helen Mendes, que foi essencial no desenvolvimento deste e de outros trabalhos desenvolvidos. Ao Dr. Gustavo Barison e Dr. Daniel Caraça, pela simpatia e colaboração. Aos colaboradores do laboratório de Anatomia Patológica – Imunoistoquímica. Em especial à Dra. Cristine Dobo e à Dra. Renée Zon Filippi, por todo apoio e experiência no desenvolvimento deste projeto.

À banca examinadora, pela disponibilidade em participar deste momento importante do meu desenvolvimento profissional. Às mulheres que participaram deste estudo como voluntárias, pela colaboração e pela confiança depositada. Aos colegas e amigos da “sala dos alunos”, que trouxeram leveza para a Pós-Graduação. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2018/11042-0) e ao Instituto ProUniemp pelo apoio financeiro para a confecção desta pesquisa. À todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho, o meu eterno agradecimento.

“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino [...]. Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando, intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a novidade.”

Paulo Freire, *Pedagogia da autonomia*, 1997

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas	xv
Resumo	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos.....	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Definição, impacto, quadro clínico e etiopatogênese da endometriose	4
2.2 Fisiopatogênese da endometriose.....	5
2.2.1 Fisiopatogênese do estresse oxidativo na endometriose	7
2.2.2 Fisiopatogênese da inflamação mediada pelas vias MAPK na endometriose	7
2.3 Senescência celular	9
2.3.1 Biomarcadores de senescência.....	12
2.3.2 p16 ^{Ink4a}	12
2.4 Aplicabilidade	15
3 MÉTODOS	16
3.1 Local do estudo e considerações éticas	16
3.2 Cálculo da amostra.....	16
3.3 Critérios de inclusão e exclusão	17
3.4 Dinâmica do estudo	18
3.5 Procedimentos laboratoriais	20
3.5.1 Transporte e armazenamento das amostras	21
3.5.2 Avaliação da fase do ciclo menstrual.....	21
3.5.3 Homogenato do tecido para análises de estresse oxidativo, SASP e MAPK	21
3.5.4 Determinação proteica.....	22
3.5.5 Avaliação de marcadores de pró senescência e co-localização: imunoistoquímica para Lamin b1, p16 ^{Ink4a} , IL-1 β	22
3.5.6 Avaliação de marcadores de pró senescência e co-localização: imunofluorescência para p16 ^{Ink4a} e Lamin b1	23
3.5.7 Geração de espécies reativas de oxigênio	24

3.5.8 Resposta antioxidante ao acúmulo de ROS intracelular: capacidade antioxidante em tecido	25
3.5.9 Dano oxidativo em lipídeos.....	25
3.5.10 Dano oxidativo em proteínas – carbonil.....	26
3.5.11 Dano oxidativo em DNA – por imunistoquímica gama-H2A (γ -H2AX).....	26
3.5.12 Dano oxidativo em DNA – 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.....	26
3.5.13 Produtos do resultado de processos inflamatórios no tecido da lesão	27
3.5.14 Proteínas da via MAPK (ERK1/2, JNK, P38, ATF2, c-Jun, p53, STAT1, MEK1, MSK1, HSP27)	28
3.6 Análise e interpretação dos dados	28
4 RESULTADOS	30
4.1 Principais achados	30
4.2 Caracterização das amostras	31
4.2.1 Comparação entre grupos controle e endometriose separados por fase de ciclo	32
4.2.2 Comparação entre fases de ciclo separadas por grupo	32
4.2.3 Relação entre idade, IMC e marcadores de senescência (p16 ^{Ink4a} , Lamin b1 e IL-1 β)	33
4.3 Comparação entre grupos	33
4.4 Verificação da presença de marcadores de células senescentes: imunistoquímica	34
4.4.1 Avaliação da concentração p16 ^{Ink4a}	35
4.4.2 Avaliação da concentração de Lamin b1	36
4.4.3 Avaliação da concentração de IL-1 β	36
4.4.4 Resumo dos resultados da expressão proteica para marcadores de células senescentes	40
4.5 Avaliação do estresse oxidativo	40
4.5.1 Dosagem de <i>ferrous oxidation</i> no tecido	43
4.5.2 Dosagem de malondialdeído no tecido.....	43
4.5.3 Avaliação de carbonil no tecido	43
4.5.4 Avaliação de dano de DNA: imunistoquímica γ -H2AX	44
4.6 Avaliação do sistema glutathiona	47
4.7 Avaliação da razão entre a produção de espécie reativa de oxigênio e o sistema glutathiona.....	48
4.8 Resumo dos resultados de estresse oxidativo	48

4.9 Citocinas e fenótipo secretor associado a senescência	49
4.10 Resumo das citocinas e fenótipo secretor associado a senescência	53
4.11 Proteínas da via MAPK na endometriose	54
4.12 Avaliações no fluido peritoneal	57
4.13 Avaliações de marcadores de estresse oxidativo	57
4.13.1 Dosagem de malondialdeído no fluido peritoneal	59
4.13.2 Avaliação de carbonil no fluido peritoneal	59
4.13.3 Avaliação das concentrações de citocinas no fluido peritoneal	59
4.13.4 Avaliação da concentração de 8-OhdG no fluido peritoneal.....	61
4.14 Avaliação da relação entre duas variáveis dosadas nos tecidos: relação entre concentração de proteínas como variável desfecho e citocinas como variável explicativa	61
4.15 Avaliação da relação entre concentração dos marcadores de estresse oxidativo como variáveis explicativas e medidas das concentrações das proteínas como variáveis desfecho	63
4.16 Avaliação da relação entre concentração de citocinas como variáveis explicativa e medidas de estresse oxidativo como variáveis desfecho	63
4.17 Avaliação da relação entre as proteínas da via MAPK como variáveis explicativas e medidas de proteínas de senescência, estresse oxidativo e citocinas como variáveis desfecho	64
4.18 Avaliação da relação entre duas variáveis no fluido peritoneal	66
4.19 Comparação entre citocinas e estresse oxidativo	67
4.20 Comparação entre dano de DNA e estresse oxidativo	68
4.21 Avaliação da colocalização das células senescentes.....	69
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÕES	85
7 REFERÊNCIAS	86
Abstract	

Lista de figuras

Figura 1. Esquema das vias MAPK	9
Figura 2. Esquema das vias de senescência celular	11
Figura 3. Dinâmica laboratorial	20
Figura 4. Representação dos principais achados na lesão em relação ao endométrio eutópico para os marcadores analisados de senescência, estresse oxidativo, SASP e MAPK	30
Figura 5. Expressão de p16 ^{Ink4a} , Lamin b1 e IL-1 β nos diferentes tecidos (controle, eutópico e lesão) em ambas as fases do ciclo menstrual (proliferativa e secretora).....	34
Figura 6. Imunoistoquímica para p16 ^{Ink4a}	37
Figura 7. Imunoistoquímica para Lamin b1	38
Figura 8. Imunoistoquímica para a proteína IL-1 β	39
Figura 9. Variações das concentrações dos marcadores de estresse oxidativo (FOX, MDA, carbonil, GSH e GSSG) em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) e fase do ciclo menstrual (fase secretora e proliferativa) tomadas no tecido de pacientes com e sem endometriose	41
Figura 10. Representação gráfica da expressão de H2AX nos diferentes tecidos (controle, eutópico e lesão) em ambas as fases do ciclo menstrual (proliferativa e secretora)	45
Figura 11. Imunoistoquímica para γ -H2AX	46
Figura 12. Concentrações das citocinas SASP clássicas (IL-1; IL-6 e IL-8) em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) e fase do ciclo menstrual (fase secretora e proliferativa) obtidas no tecido de pacientes com e sem endometriose	49
Figura 13. Concentrações das citocinas pró-inflamatórias SASP não clássicas (IL-2; IL-15 e IL-17) em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) e fase do ciclo menstrual (fase secretora e proliferativa) tomadas no tecido de pacientes com e sem endometriose	50
Figura 14. Concentrações das citocinas anti-inflamatórias SASP não clássicas (IL-4, IL-10) em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) e fase do ciclo menstrual (fase secretora e proliferativa) tomadas no tecido de pacientes com e sem endometriose ...	50

Figura 15. Concentrações dos fatores de crescimento e tumoral (EGF, VEGF, TGF- α e TNF) em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) e fase do ciclo menstrual (fase secretora e proliferativa) tomadas no tecido de pacientes com e sem endometriose ...	51
Figura 16. Concentrações das proteínas da via MAPK em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)	54
Figura 17. Concentrações das proteínas da via MAPK em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)	55
Figura 18. Concentrações das proteínas da via MAPK em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)	55
Figura 19. Concentrações de carbonil e MDA em amostras de fluido peritoneal de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa).....	58
Figura 20. Representação das relações entre p16 ^{Ink4a} , IL-1 β , Lamin b1 e H2AX e as citocinas, controlando por tipo de tecido (controle, eutópico e lesão) e fase do ciclo (proliferativa e secretora).....	62
Figura 21. Representação das relações entre carbonil, FOX, MDA, GSH e GSSG e o as proteínas (p16 ^{Ink4a} , IL-1 β , Lamin b1 e H2AX), controlando por tipo de tecido (controle, eutópico e lesão) e fase do ciclo (proliferativa e secretora).....	63
Figura 22. Representação das relações entre as citocinas e os marcadores de estresse oxidativo (carbonil, FOX, MDA, GSH e GSSG), controlando por tipo de tecido (controle, eutópico e lesão) e fase do ciclo (proliferativa e secretora).....	64
Figura 23. Representação das relações entre as proteínas da via MAPK e as proteínas marcadores de senescência, controlando por tipo de tecido (controle, eutópico e lesão) e fase do ciclo (proliferativa e secretora)	65
Figura 24. Representação das relações entre as proteínas da via MAPK e os marcadores de estresse oxidativo (carbonil, FOX, MDA, GSH e GSSG), controlando por tipo de tecido (controle, eutópico e lesão) e fase do ciclo (proliferativa e secretora).....	65
Figura 25. Representação das relações entre as proteínas da via MAPK e das citocinas, controlando por tipo de tecido (controle, eutópico e lesão) e fase do ciclo (proliferativa e secretora)	66
Figura 26. Colocalização da marcação da proteína p16 ^{Ink4a} e Lamin b1 co-marcados com e-caderina em tecido de endometriose	70

Lista de tabelas

Tabela 1. Caracterização demográfica geral da amostra utilizada para todos os experimentos	18
Tabela 2. Dados fenotípicos das pacientes selecionadas.....	18
Tabela 3. Tipos de lesões encontradas nas cirurgias	18
Tabela 4. Organização dos experimentos e número de pacientes por etapa dentro do grupo endometriose.....	31
Tabela 5. Organização dos experimentos e número de pacientes por etapa dentro do grupo controle.....	32
Tabela 6. Relação entre as medidas de expressão de proteínas com idade e IMC	33
Tabela 7. Descrição das médias de expressão de proteínas (IL-1 β , p16 ^{Ink4a} e Lamin b1) em pacientes com e sem endometriose nas duas fases do ciclo menstrual (fase secretora e proliferativa).....	35
Tabela 8. Relações das expressões de proteínas (IL-1 β , p16 ^{Ink4a} e Lamin b1) em tecido (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa).....	35
Tabela 9. Resumo dos principais achados para as médias estimadas das proteínas p16 ^{Ink4a} , IL-1 β e Lamin b1 na comparação da lesão com endométrio eutópico e controle com endométrio eutópico todos nas fases secretora e proliferativa	40
Tabela 10. Concentrações de marcadores de estresse oxidativo em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa).....	42
Tabela 11. Relações das quantificações de estresse oxidativo em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa).....	42
Tabela 12. Descrição das médias de expressão da proteína γ -H2AX nos tecidos (endométrio controle, endométrio eutópico e lesão).....	45
Tabela 13. Relações das quantificações de 8OhdG em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)	47
Tabela 14. Principais achados para as médias estimadas dos marcadores de estresse oxidativo carbonil, malondialdeído e FOX na comparação da lesão com endométrio	

eutópico e controle com endométrio eutópico todos nas fases secretora e proliferativa	48
Tabela 15. Relações das quantificações das citocinas em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)	52
Tabela 16. Resumo dos principais achados para as médias estimadas das concentrações de citocinas nos tecidos (controle, eutópico e lesão) na fase secretora	53
Tabela 17. Resumo dos principais achados para as médias estimadas das concentrações de citocinas nos tecidos (controle, eutópico e lesão) na fase proliferativa	54
Tabela 18. Valores médios estimados proteínas da via MAPK em amostras de tecidos (endométrio controle, endométrio eutópico e lesão) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)	56
Tabela 19. Relações das proteínas da via MAPK em tecidos (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)	56
Tabela 20. Valores médios das concentrações de carbonil e MDA em amostras de fluido peritoneal de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)	58
Tabela 21. Resultados das quantificações de estresse oxidativo obtidas em fluido peritoneal de paciente com e sem endometriose (fase proliferativa e secretora)	58
Tabela 22. Valores médios estimados das citocinas em fluido peritoneal de pacientes com e sem endometriose (fase proliferativa e secretora)	59
Tabela 23. Resultados das quantificações de citocinas obtidas em fluido peritoneal de paciente com e sem endometriose (fase proliferativa e secretora)	60
Tabela 24. Modelo misto para a variável de dano de DNA como desfecho no fluido peritoneal de pacientes com e sem endometriose, tendo como referência o grupo controle na fase secretora	61
Tabela 25. Comparação das citocinas como variáveis explicativas e marcadores de estresse oxidativo como variáveis desfecho no fluido peritoneal controlando por tipo de paciente (endometriose e controle) e fase do ciclo menstrual (proliferativa e secretora)	67
Tabela 26. Comparação dos marcadores de estresse oxidativo como variáveis desfecho e 8-OHdG como variável explicativa no fluido peritoneal controlando por tipo de paciente (endometriose e controle) e fase do ciclo menstrual (proliferativa e secretora)	68

Lista de abreviaturas

8OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (<i>8-hydroxy-2'-deoxyguanosine</i>)
ATF-2	Fator de transcrição ativador 2
BHT	Butil-hidroxitolueno
CREB	Fator de transcrição nuclear
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
<i>ERK</i>	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FOX	Oxidação férrica (<i>Ferrous oxidation</i>)
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
H2AX	Proteína histona da família H2A
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC	Intervalo de confiança
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
JAK/STAT	Janus Kinase/Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
JNK	<i>c-Jun NH2-terminal kinase</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
NF-κB	Fator nuclear kappa-B
RL	Radical livre
RM	Razão de médias
SASP	Fenótipo secretor associado à senescência (<i>Senescence-associated secretory phenotype</i>)
STAT1	Fator transdutor de sinal e ativador de transcrição 1
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-α	Fator de crescimento transformador alfa
TMP	1,1,3,3- tetrametoxipropano
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
γ-H2AX	Gama H2AX

Resumo

Introdução: Endometriose é caracterizada por implante e crescimento de tecido endometrial fora da cavidade uterina. A fisiopatologia da endometriose pode ser sustentada por processos inflamatórios, estresse oxidativo e fatores imunológicos. A senescência celular é um processo irreversível de suspensão da proliferação celular e está associada a alterações imunológicas, aumento de estresse oxidativo e resistência à apoptose. Assim, considerando as características da endometriose, como resistência à apoptose, presença de fatores imunológicos e inflamatórios e estresse oxidativo, acreditamos que exista um acúmulo de células senescentes nas lesões de endometriose e que o estresse oxidativo peritoneal, possa ser uma das vias mais robustas para a ativação de células senescentes na lesão de endometriose. **Objetivo:** Comparar e localizar biomarcadores de células senescentes, de estresse oxidativo fenótipo secretor associados a senescência e proteínas das vias MAPK em lesões de endometriose profunda em relação ao endométrio. **Métodos:** Utilizamos biópsias e fluido peritoneal para testar a hipótese, sendo coletadas amostras de endométrio eutópico e lesão profunda retrocervical de 27 pacientes com endometriose. Foram coletadas biópsias 19 pacientes sem endometriose avaliando-se marcadores de senescência, de estresse oxidativo, citocinas associadas ao fenótipo secretor associados a senescência e proteínas da via MAPK. **Resultados:** Encontramos maior concentração de marcadores de senescência, assim como um ambiente mais oxidativo nas lesões comparado ao endométrio eutópico de pacientes com endometriose. Observamos um aumento nas proteínas da via MAPK nas lesões. O aumento de marcadores de senescência, estresse oxidativo e da via MAPK estão relacionados com um ambiente mais inflamatório, o qual é um marcador de senescência nas lesões de endometriose. **Conclusão:** Na endometriose há um aumento de marcadores de senescência. Sabemos que o acúmulo de células senescentes prejudica a homeostase do tecido, alterando função celular e auxiliando na manutenção de diversas doenças crônicas. Compreender o processo de senescência na endometriose poderá nos auxiliar no desenvolvimento de novas terapias.

Descritores: Endométrio; Senescência celular; Estresse oxidativo; Inflamação

1 INTRODUÇÃO

Endometriose é uma doença ginecológica benigna, cujo tratamento definitivo ainda não foi comprovado.⁽¹⁾ Sua prevalência é de 10%⁽²⁾ da população feminina em idade reprodutiva e tem como principais sintomas a dor pélvica e a infertilidade.^(3,4)

Muito já se investigou sobre a etiopatogênese e fisiopatogênese da doença, como uma forma de entender seu início e sua manutenção para que fosse possível traçar uma linha de tratamento mais definitiva. Atualmente, a terapêutica pode variar entre combinações hormonais [por ser uma doença estrogênio-dependente e resistente a progesterona,⁽⁵⁾] anti-inflamatórias [estudos comprovam aumento de processos inflamatórios nas pacientes⁽⁶⁾] e cirurgias de excisão das lesões [quando os tratamentos são ineficientes na mitigação dos sintomas ou há comprometimento anatômico severo,⁽⁷⁾] entre outros.

As teorias etiopatogênicas desenvolvidas até o presente explicam, cada uma isoladamente, um fator associado a endometriose, mas nenhuma consegue esclarecer a doença e seus variados sintomas como um todo.⁽⁸⁾ As teorias de surgimento da endometriose vão de sangramento uterino neonatal em consequência da insuficiência placentária⁽⁹⁾ à alterações (epi)genéticas,⁽¹⁰⁾ envolvendo também origem através de células endometriais e de outros tipos de células.

Outra grande questão envolvendo a doença é a classificação das lesões, o comportamento de cada um dos tipos e também sua provável origem,⁽¹¹⁻¹³⁾ sendo aceito classificá-las como lesões peritoneais superficiais, lesões profundas (com mais de cinco mm) e endometriomas ovarianos.⁽¹⁴⁾ Entretanto, encontram-se outras formas de classificação, tornando os estudos mais difíceis de serem comparados, por exemplo, em metanálise, replicados e transformados em estudos clínicos.

Embora as teorias possam explicar o início da doença, são necessários outros fatores associados para que haja o desenvolvimento dos implantes endometrióticos e sua manutenção ao longo do tempo. São esses os trabalhos desenvolvidos com o intuito de estudar a fisiopatologia da endometriose. Por exemplo, como se dá o comportamento de cada tipo de lesão e como ocorre a manutenção da doença na cavidade pélvica, uma vez que já tenha ocorrido a implantação das células alteradas e como as lesões estão associadas a diferentes sintomas. Os estudos visam

entender, por exemplo, como essas células “escapam” ao sistema imune das pacientes,⁽¹⁵⁾ como ocorre a adesão ao peritônio,^(16,17) estabelecimento, neovascularização e angiogênese local^(18,19) e o crescimento e sobrevivência contínuos necessários para a manutenção da endometriose.⁽²⁰⁾ Coletivamente, discute-se: predisposição genética,⁽²¹⁾ dependência de estrogênio e resistência à progesterona,⁽²²⁾ inflamação⁽²³⁾ e, no caso do presente estudo, a senescência celular nas lesões⁽²⁴⁾ como fatores que auxiliam na manutenção da endometriose.

Questiona-se a relação que possa existir entre a endometriose e alterações da microbiota das pacientes,⁽²⁵⁾ assim como a ligação entre alterações imunológicas e o aparecimento de dor pélvica e também infertilidade.⁽²⁶⁾ Outro fator importante, que será discutido com mais detalhes, é o estresse oxidativo na endometriose.⁽²⁷⁾ Sabe-se que tanto o fluido peritoneal,⁽²⁸⁾ quanto o fluido folicular ovariano⁽²⁹⁾ e o soro⁽³⁰⁾ de pacientes com endometriose apresentam maiores concentrações de espécies reativas de oxigênio, diminuição da atividade antioxidante e, portanto, um aumento do estresse oxidativo local.⁽³¹⁾ Apesar de haver associação entre estresse oxidativo e endometriose, não foi possível ainda estabelecer um tratamento baseado em antioxidantes ou tampouco concluir se o estresse oxidativo é causa ou consequência da doença.⁽³²⁾

Nosso trabalho pretende incluir no rol de fatores associados à manutenção da endometriose, a presença de células senescentes como uma forma de sustentação das lesões profundas.⁽²⁴⁾ A senescência celular é capaz de paralisar a replicação celular e manter a célula viva e ativa por tempo indeterminado em uma condição distinta da qual ela foi originalmente proposta.⁽³³⁾ Os meios pelo quais as células entram em senescência podem ser distintos e a sua presença nem sempre indica uma doença.⁽³⁴⁾ Portanto, para esclarecer a relação entre endometriose, estresse oxidativo e senescência celular iremos aprofundar em alguns tópicos, através de uma revisão de literatura. Acreditamos que, desta forma será possível então, o entendimento da doença, o envolvimento do estresse oxidativo na endometriose e porque acreditamos que a senescência celular, como consequência do aumento do estresse oxidativo, poderia auxiliar na manutenção da doença e, dessa forma, sermos capazes de propor uma nova linha de tratamento.

1.1 Objetivos

1. Verificar a presença de marcadores de células senescentes em lesões de endometriose profunda e comparar ao endométrio da mesma paciente; comparar os marcadores de células senescentes do endométrio de mulheres com e sem endometriose;
2. Avaliar o estresse oxidativo (antioxidantes, danos celulares, marcadores de estresse oxidativo) na lesão de endometriose profunda, endométrio e no fluido peritoneal de pacientes com e sem endometriose;
3. Avaliar a presença de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que compõem o fenótipo secretor associado a senescência tanto no fluido peritoneal quanto nos tecidos de pacientes com endometriose;
4. Avaliar se há relação entre as proteínas biomarcadores de senescência e os marcadores de estresse oxidativo;
5. Avaliar se há relação entre as proteínas biomarcadores de senescência e os marcadores de fenótipo secretor associado à senescência;
6. Avaliar se há relação entre os marcadores de estresse oxidativo e os de fenótipo secretor associado à senescência;
7. Colocalizar os marcadores de senescência celular com os compartimentos celulares específicos;
8. Avaliar as principais proteínas das vias MAPK na lesão de endometriose profunda e no endométrio de pacientes com e sem endometriose;
9. Avaliar o dano ao DNA nos tecidos (endométrio e lesão de endometriose profunda) e fluido peritoneal de paciente com e sem endometriose.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Definição, impacto, quadro clínico e etiopatogênese da endometriose

A definição básica da endometriose é a presença de implantes e crescimento de tecido histologicamente semelhante ao endométrio (presença de glândulas e/ou estroma) fora do útero, estando estes em sua grande maioria, mas não exclusivamente, na cavidade peritoneal.^(12,27,35) O tecido que nos referimos anteriormente é usualmente chamado de endométrio ectópico ou lesão endometriótica. Para fins de entendimento do texto, trataremos daqui para frente como lesão.

A acurada prevalência da endometriose ainda é incerta. Estudos epidemiológicos mostram uma prevalência média de 10% da endometriose na população pré-menopausa,^(36,37) além de ser uma das maiores causas ginecológicas de admissões hospitalares.^(38,39) Taxas de prevalência de 2 a 4% em pacientes assintomáticas (ligadura de trompas), 5 a 50% em pacientes inférteis e 5 a 21% em pacientes com dor pélvica foram reportadas.⁽⁴⁰⁾ Uma revisão sistemática publicada recentemente demonstrou que a prevalência está entre 1 a 5% e uma incidência entre 1,3 a 3,5%, porém apresentam metodologias de avaliação distintas e os trabalhos com menor risco de viés apresentavam as maiores e menores taxas de prevalência.⁽⁴¹⁾ Em populações específicas, encontramos incidência com variação entre 0,112⁽⁴²⁾ a 0,72%,⁽⁴³⁾ sendo que um estudo com duração de 20 anos determinou incidência de 0,1% nos casos de endometriose diagnosticada através da visualização da lesão e 0,06% nos casos de confirmação histopatológica.⁽⁴⁴⁾

Apesar do real número de mulheres com endometriose ainda não ter sido calculado,⁽⁴³⁾ extrapola-se que, em todo o mundo, o número chegue a 190 milhões.⁽⁴⁵⁾ Dessa forma, se pensarmos nos custos de diagnóstico e tratamento anuais, que chegam a somar €10.000 em países europeus; \$4.000 dólares por paciente segundo o sistema de saúde americano⁽⁴⁶⁾ e \$1.8 bilhões por ano somando todos os gastos no Canadá,⁽⁴⁷⁾ juntamente com os altos índices de ausência no trabalho,⁽⁴⁾ impacto na saúde física e psicológica das pacientes,^(36,48,49) como pelo impacto socioeconômico diante de possíveis consequências na vida escolar,⁽⁵⁰⁾ esta doença pode ser considerada um problema de saúde pública^(39,51,52) e merece atenção.^(53,54)

O quadro clínico da endometriose pode estar associado à infertilidade, comprometimento da qualidade oocitária,^(32,55,56) efeitos adversos na gestação,^(57,58) dismenorreia, dispareunia de profundidade, dor pélvica acíclica, alterações do hábito intestinal e urinário.^(59,60) Outros sintomas como fadiga, inchaço ou náusea, principalmente durante os períodos menstruais, somatização, depressão e ansiedade, também são observados em pacientes com endometriose quando comparados aos grupos de mulheres sem a doença.^(49,61) A presença de quadro clínico sugestivo exige investigação com ressonância magnética ou ultrassonografia pélvica com preparo intestinal realizados por médico especialista⁽¹²⁾ e por fim o diagnóstico completo se dá através da laparoscopia e análise histopatológica.⁽⁶²⁾

A etiopatogênese da endometriose ainda não é clara, contudo as teorias que circundam o surgimento das lesões vão desde influência das células endometriais até hipóteses em que não há uma origem celular uterina para o aparecimento da endometriose.⁽⁶³⁾ A teoria mais difundida, e a qual acreditamos se encaixar melhor na nossa hipótese de manutenção da lesão através do acúmulo de células senescentes, foi descrita por Sampson em 1927 e estabelece que a menstruação retrógrada, por meio das tubas uterinas, se associa ao aparecimento das lesões de endometriose na cavidade peritoneal.⁽⁶⁴⁾ Essa teoria é reforçada por diversos fatores, onde a própria menstruação retrógrada já foi constatada em 90% das mulheres durante o período menstrual,⁽⁶⁵⁾ assim como pela localização das lesões, nos ovários, na parte posterior da cavidade peritoneal e ligamentos úteros-sacros, o que é coincidente com a abertura das tubas uterinas.⁽⁶⁴⁾

2.2 Fisiopatogênese da endometriose

A teoria de Sampson é insuficiente para explicar a etiopatogênia da doença, pois 10% das mulheres desenvolvem endometriose, enquanto que 90% possuem sinais de menstruação retrógrada, o que instigou os cientistas a procurarem fatores associados à manutenção e proliferação da doença.⁽⁶⁶⁾ Após o refluxo menstrual, as células endometriais que se alojaram na cavidade peritoneal sofrem modificações genéticas, proteicas e metabólicas para se proliferarem e diferenciarem, criando uma vascularização local e estabelecimento da lesão.^(63,67) A geração da lesão depende de processos de migração, implantação, proliferação e invasão celular. Neste

contexto, alterações celulares (aumento da expressão de receptores de estrógeno; alteração na liberação de citocinas e interleucinas; adesão celular; etc.) e do ciclo celular (aumento dos níveis de proliferação celular e resistência a apoptose) são observadas.⁽⁴⁵⁾ Essas mudanças no comportamento celular surgem como os principais mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da endometriose.⁽⁶⁸⁾

Foi observado menor potencial apoptótico mas também menor índice proliferativa em células da lesão em comparação ao endométrio, indicando maior sobrevivência das células ectópicas na cavidade peritoneal.⁽⁶⁹⁾ Além disso, a fisiopatologia da endometriose pode ser sustentada por outros fatores como predisposição genética, alterações hormonais, como a resistência à progesterona, dependência de estrogênio, processos inflamatórios, angiogênicos, vascularigênicos, estresse oxidativo, resistência à apoptose e fatores imunológicos.^(63,70)

Atualmente, é aceito que o estresse oxidativo esteja implicado na fisiopatologia da endometriose,⁽⁷¹⁾ causando uma resposta inflamatória na cavidade peritoneal,^(72,73) no fluido folicular⁽⁷⁴⁾ e alguns autores também demonstram diferenças sistêmicas entre pacientes com e sem endometriose.⁽³⁰⁾

A presença de células semelhantes ao endométrio na cavidade peritoneal também está associada ao aumento de fatores inflamatórios e alterações imunológicas.⁽⁷⁵⁾ Nesse processo, estão envolvidas atividades como aumento da capacidade angiogênica^(19,76) influenciada por citocinas e fatores de crescimento, como fator de crescimento transformador, interleucina-8, interleucina-1, fator de necrose tumoral e interferon-gama,⁽⁷⁷⁾ capacidade proliferativa⁽⁷⁸⁾ e recrutamento de células do sistema imune como macrófagos,⁽⁷⁹⁾ células *natural killer* (NK)⁽⁸⁰⁾ e neutrófilos.⁽⁸¹⁾

Por ser uma doença inflamatória crônica, a inflamação desempenha um papel fundamental na manutenção da endometriose no controle da sobrevivência, proliferação ou apoptose celular, e manutenção das respostas celulares. O ambiente influencia os receptores de membrana e quinases intracelulares que atuam como moduladores inflamatórios e são regulados por diversas vias de sinalização: fator nuclear kappa-B (NF-kB), Janus Kinase/Transdutores de sinal e ativadores de transcrição (JAK/STAT) e através das vias proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que está desregulada nas lesões.⁽⁸²⁾

2.2.1 Fisiopatogênese do estresse oxidativo na endometriose

Há na literatura científica diversos estudos com o intuito de encontrar algum marcador sanguíneo para o diagnóstico da endometriose, entretanto não há, ainda, um que se destaque e que possa ser utilizado como diagnóstico. O que se sabe é que existem diferenças entre o comportamento dessas moléculas em mulheres com e sem endometriose.⁽⁸³⁾ Da mesma forma, já foi demonstrado o aumento do estresse oxidativo no fluido folicular^(55,56,84) e também no fluido peritoneal,^(32,85) estando estes associados ao desenvolvimento anormal de oócitos, causando danos ao DNA, citoesqueleto e membrana celular, o que resultaria em menor qualidade dos oócitos e futuramente embriões, levando a uma infertilidade associada à endometriose.

O aumento do número de macrófagos na cavidade peritoneal parece também estar relacionado como indutor potencial de estresse oxidativo.^(86–88) Realmente, a concentração peritoneal de macrófagos parece ser maior em mulheres com endometriose, lembrando que os macrófagos são responsáveis por liberarem prostaglandinas (que auxiliam na manutenção da dor nessas pacientes), citocinas, fatores de crescimento e outras enzimas.⁽⁷⁹⁾

Na cavidade peritoneal, o estresse oxidativo parece agir levando ao dano oxidativo macromolecular, lesão tecidual, inflamação crônica,^(28,89,90) e regulando a expressão de genes que codificam imunorreguladores, citocinas e moléculas de adesão celular. Esse processo é facilitador da angiogênese e vascularigênese, adesão, proliferação e invasão celular das lesões de endometriose na cavidade peritoneal,⁽⁷³⁾ assim como promotor de danos à proteínas, lipídeos e às membranas celulares, causando fragmentação do DNA, apoptose ou à senescência^(28,33,73,88,91,92) através da ativação das vias da MAPK. Trabalhos sugerem a relação entre o estresse oxidativo, a via MAPK e a regulação do ciclo celular.^(93,94)

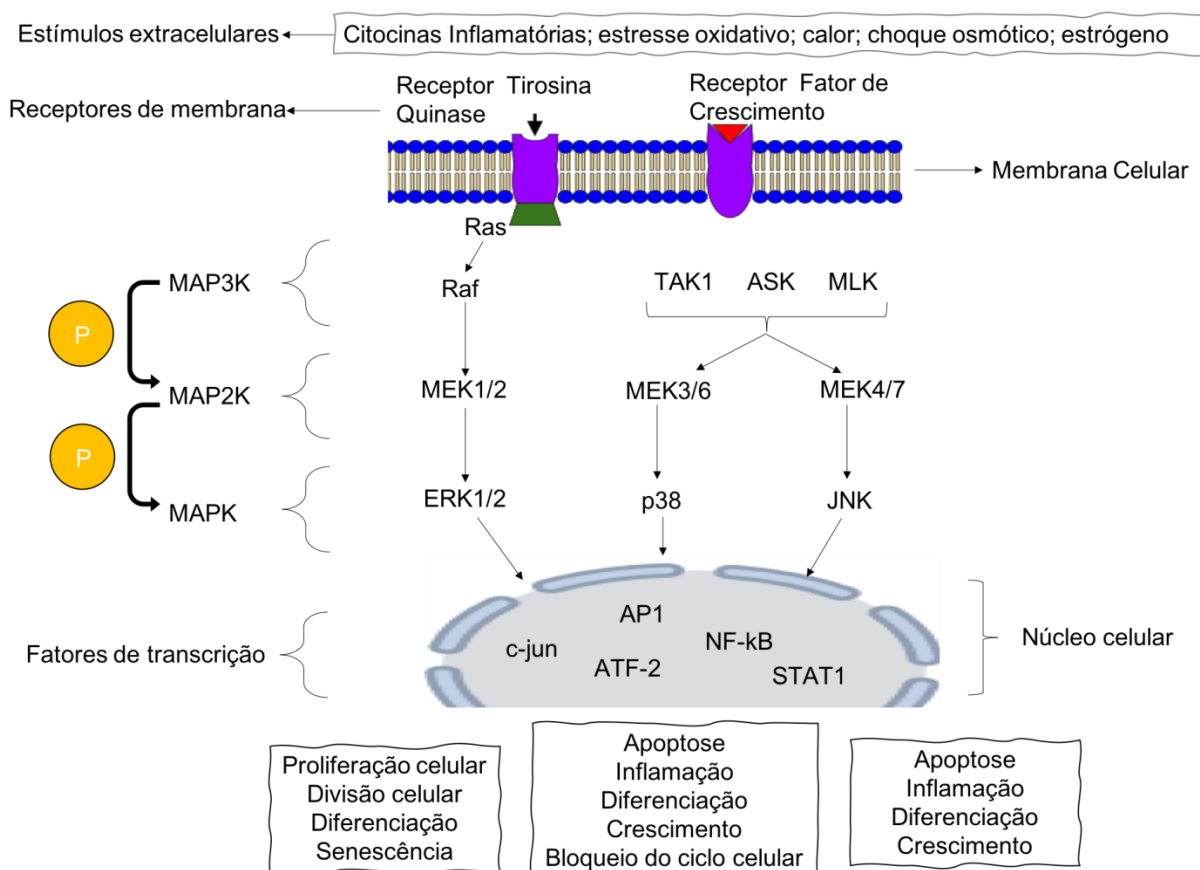
2.2.2 Fisiopatogênese da inflamação mediada pelas vias MAPK na endometriose

As vias MAPK permitem respostas coordenadas a diversos estímulos, orquestrando genes de transcrição, síntese de proteínas, apoptose, diferenciação e ciclo celular e podem ser subdivididas em três principais vias controladas *downstream* pelas MAPKs: *Extracellular signal-regulated kinases (ERK)*,

p38, e *c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)*⁽⁹³⁾ (Figura 1). A ativação das MAPKs pode ocorrer por diversos estímulos extracelulares. A ERK é predominantemente ativada por inflamação e fatores de crescimento, sendo também ativadas por estresse oxidativo e alterações hormonais. A JNK e p38 são majoritariamente ativadas por estresse e citocinas inflamatórias.⁽⁹⁵⁾ Uma vez ativada, as MAPKs iniciam uma resposta celular por meio de fatores de transcrição nuclear, como transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1), fator de transcrição nuclear (CREB), fator de transcrição ativador 2 (ATF-2), e c-Jun que em combinação com c-fos formam a proteína ativadora 1 (AP-1) e p53.⁽⁹⁵⁾ Na endometriose, estudos mostram uma desregulação nas vias MAPK,^(96,97) sendo através da ERK,⁽⁹⁸⁾ da p38⁽⁹⁹⁾ ou JNK.⁽¹⁰⁰⁾

A ativação das vias MAPK seguem uma tripla cascata de eventos que culminam com a ativação dos fatores de transcrição nucleares descritos acima. Na figura 1 podemos observar resumidamente as principais proteínas envolvidas na cascata de eventos das vias MAPK na endometriose. Os receptores da membrana celular (receptor tirosina quinase; receptor *toll-like*; receptores de citocinas) são estimulados por fatores extracelulares (citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e fatores de crescimento). Após a excitação, esses receptores estimulam as moléculas de sinalização MAP3K (Raf; TAK1; ASK; etc.), que transmitem o sinal para as MAP2K (MEK1-7). Após a fosforilação das MAP2K, estas ativam as MAPKs (ERK1/2; p38; JNK). As MAPKs translocam-se ao núcleo celular onde se ligarão aos fatores de transcrição (c-Jun; ATF2; STAT1, AP1, etc.) dando início a possíveis alterações gênicas, tanto na ativação quanto no bloqueio de genes responsáveis por síntese de proteínas, diferenciação e controle do ciclo celular, como proliferação, apoptose e senescência.

As vias de sinalização MAPK podem possuir formas distintas de atuação na resposta inflamatória da endometriose.⁽⁹⁷⁾ A via mediada por ERK, está envolvida ao crescimento, proliferação e sobrevivência celular.^(96,98) A MAPK p38, tem um papel central e crítico na regulação de várias doenças imunológicas e está associada a inflamação, crescimento celular, diferenciação e morte celular.⁽⁹⁹⁾ Por fim, a via de sinalização JNK, uma via de ativação por estresse celular, é reguladora da proliferação celular e apoptose.⁽¹⁰⁰⁾ Todas essas características estão presentes na endometriose, o que faz da via MAPK um alvo a ser investigado.



Via MAPK na endometriose. Principais proteínas envolvidas na ativação da via. MAP3K: proteínas quinases ativadas por mitógeno; MAP2K: proteínas quinases ativada por mitógeno; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; Ras: tirosina quinases associadas às pequenas proteínas guanossina trifosfato (GTPases); Raf: quinase específica para Ser/Thr; MEK: quinase ativadora da MAP quinase; ERK: quinase extracelular regulada por sinal (MAPK); TAK: proteínas quinases ativada por mitógeno (MAP3K); ASK: proteína quinase ativada por mitógeno (MAP3K); MLK: proteína quinase ativada por mitógeno (MAP2K), p38, JNK proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), c-Jun, AP1: proteína ativadora, ATF-2: fator de transcrição ativador, NF-kB: fator nuclear kappa beta, STAT1: transdutor de sinal e ativador da transcrição.

Fonte: McKinnon BD, Kocbek V, Nirgianakis K, Bersinger NA, Mueller MD. Kinase signalling pathways in endometriosis: potential targets for non-hormonal therapeutics. Hum Reprod Update. 2016;22(3):382–403.⁽⁹⁵⁾

Figura 1. Esquema das vias MAPK

2.3 Senescência celular

A senescência é um processo irreversível de suspensão da proliferação celular, que ocorre em todas as células somáticas dos organismos multicelulares e leva a célula ao final do seu potencial de divisão, impossibilitando-a de replicar seu DNA.⁽¹⁰¹⁾ Entretanto, em estado de senescência a célula permanece ativa por tempo indeterminado, tendo vida longa, e com isso mantém a síntese de metabólitos funcional, fenômeno conhecido como fenótipo secretor associado à senescência (SASP – *senescence-associated secretory phenotype*).^(33,101) Essas

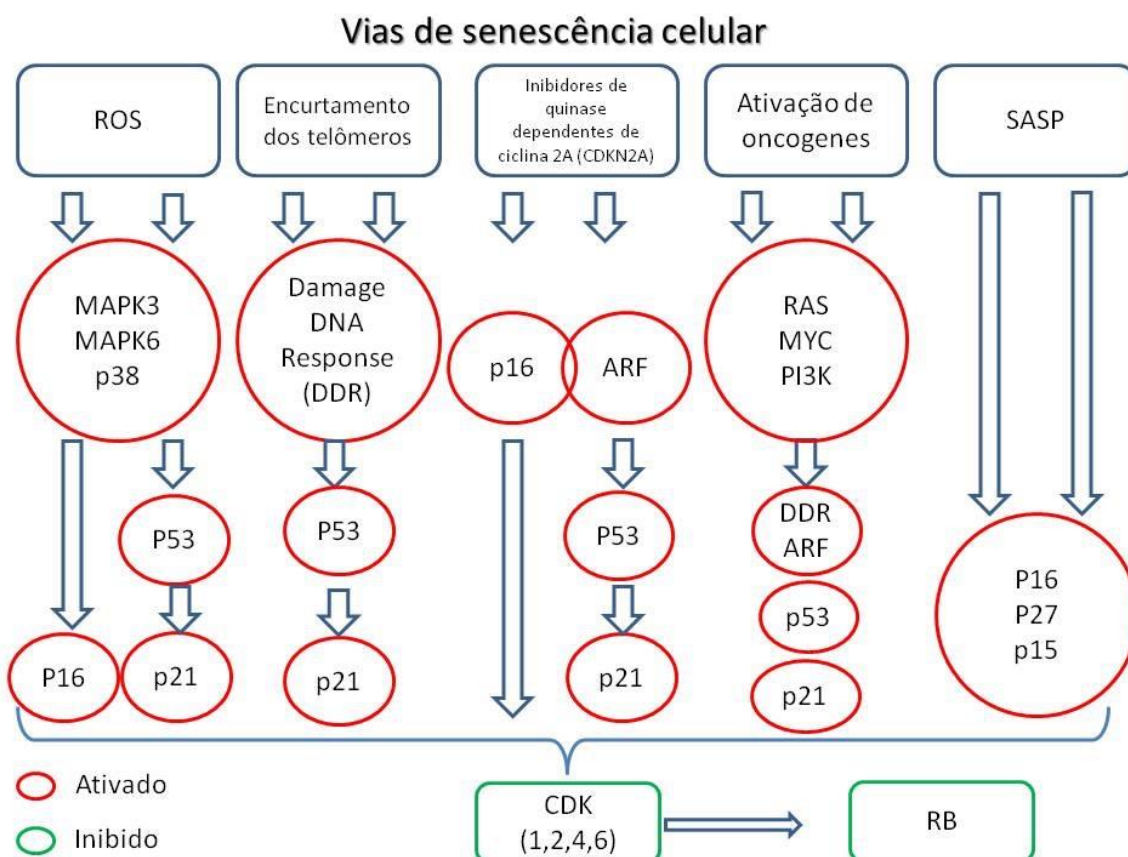
células secretam fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e citocinas inflamatórias, além de serem resistentes à apoptose, tendo vida longa.^(34,102,103)

O estado de senescência é considerado uma barreira natural contra proliferação descontrolada de uma célula danificada, protegendo o organismo contra aparecimento e crescimento de tumores e doenças, reparando células danificadas.⁽³³⁾ Por outro lado, o processo cumulativo de senescência está associado à perda das funções das células afetadas, contribuindo para a perda de função do tecido.^(103,104)

Há diversos mecanismos associados ao surgimento de células senescentes no organismo, como diminuição do tamanho dos telômeros, exposição à irradiação de raios ultra violeta A e B, estresse oxidativo, danos ao DNA, super expressão de oncogênes, ruptura da heterocromatina, disfunção de mitocôndrias, alterações ambientais e nutricionais e condições patológicas.^(101,105)

Na cultura celular é possível observar a senescência replicativa, fenômeno que ocorre após determinado número de divisões celulares em consequência da diminuição do comprimento dos telômeros (processo natural de toda divisão celular) e também por instabilidade genômica. Outros fenômenos estão relacionados com a ativação das vias de controle do ciclo celular,^(33,106–109) entretanto, a senescência celular causada por outros fatores que não o encurtamento dos telômeros é frequentemente chamada senescência induzida por estresse ou senescência prematura, e tem como um dos caminhos a via p16^{INK4A}/Rb, conforme quadro explicativo na figura 2.

As células senescentes possuem características distintas como morfologia mais alargada e achatada, presença de vacúolos, muitas vezes multinucleação e expressão gênica diferenciada da β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal).^(110,111) Existem atualmente vários biomarcadores utilizados para a detecção de células senescentes em um determinado tecido, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, como p16^{Ink4a}, p21, p38, SA-b-gal, Lamin b1.^(112–114) Contudo, não se pode aferir a caracterização das células senescentes a apenas um marcador específico, sendo que as diversas características e marcadores utilizados em conjunto formam uma boa ferramenta para localização dessas células.⁽¹¹⁴⁾



Esquema das vias de senescência celular. ROS: espécies reativas de oxigênio; SASP: fenótipo secretor associado à senescência; MAPK: proteíno-quinases ativadas por mitógenos; ARF: proteína inibidora do ciclo celular; RAS, MYC e PI3K: oncôgenes; RB: proteína do retinoblastoma; CDK: quinase dependente de ciclina; DDR: Resposta ao Dano de DNA (*Damage DNA Response*).

Fonte: Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(7):482-96.⁽³³⁾

Figura 2. Esquema das vias de senescência celular

O ciclo celular é composto por quatro fases (G1, S, G2 e M) e a transição entre as fases é controlada por ciclinas-quinase dependente de ciclinas (CDKs). Existem pontos de verificação entre as fases, que não apenas regulam o ciclo celular, mas também garantem que a fase anterior foi plenamente finalizada. Na regulação do ciclo celular, os eventos que ocorrem no ponto de restrição G1/S são vitais para a manutenção da proliferação e diferenciação celular, pois podem dar sequência à replicação celular ou à parada do ciclo. O evento de transição entre a fase G1 e a fase S depende da atividade do complexo ciclina D1-CDK4/6, que induz a fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb) e com isso a liberação do fator de transcrição E2F, que está normalmente associado ao Rb, dando início a progressão de G1 para S.⁽¹¹⁵⁾

Existem mecanismos de inibição das CDKs, compostos pelas famílias de inibidores Cip/Kip e INK4, responsáveis pela atividade anti-proliferativa que

causa a parada do ciclo celular. Os membros da família Cip/Kip, incluem p21, p27 e p57 e os membros da família INK4 incluem p15, p16^{Ink4a}, p18 e p19. A atividade de p16^{Ink4a} regula negativamente a progressão do ciclo celular e leva à parada na fase G1. A proteína p16^{Ink4a} compete com a ciclina D1, formando um complexo p16-CKD4 inativo, causando interrupção transitória ou duradoura do ciclo celular G1, que em determinadas situações pode culminar com a interrupção total do ciclo celular ou senescência.^(115,116)

2.3.1 Biomarcadores de senescência

Biomarcadores da regulação do ciclo celular são genes e proteínas envolvidas na ativação de vias de proliferação, apoptose e senescência. Na senescência, as vias de ação comportam as proteínas, p16^{Ink4a} e p53/p21, que são supressoras de tumores e essenciais para a manutenção da senescência.⁽¹¹⁷⁾ Vimos em estudo piloto, com marcadores histológicos, que a proteína p21 não é expressa ou sua atividade está reduzida em tecidos de endometriose e endométrio de pacientes com e sem endometriose, entretanto a proteína p16^{Ink4a} está presente em tecidos de pacientes com e sem endometriose.⁽²⁴⁾

2.3.2 p16^{Ink4a}

O gene p16^{Ink4a} e sua proteína tem um papel crítico no controle de envelhecimento, na regulação da senescência celular, detecção e manutenção de danos ao DNA, sendo um potente inibidor da proliferação celular. O mecanismo molecular por trás desses eventos envolve o controle das vias pRB e p53. Já foi demonstrado que o p16^{Ink4a} está mais expresso em células senescentes de fibroblastos humanos cultivados *in vitro* e que essa maior expressão pode estar associada à manutenção da senescência celular. Existe maior expressão de p16^{Ink4a} em ratos adultos quando comparados a ratos jovens, assim como em humanos, sendo o p16^{Ink4a} um ótimo biomarcador para envelhecimento.⁽¹¹⁸⁾

2.3.3 Lamin b1

Lamin b1 é uma proteína encontrada na membrana nuclear de todas as células.⁽¹¹⁹⁾ Ela está associada à manutenção da estruturação da membrana nuclear, além de participar de outros processos do ciclo celular como replicação de DNA e organização da cromatina.⁽¹²⁰⁾ Na literatura associaram baixos níveis de Lamin b1 com a síndrome prematura de envelhecimento Hutchinson-Gilford.⁽¹²¹⁾ A literatura não indica uma causa ou consequência da depleção de Lamin b1 à senescência celular, porém observa-se que células senescentes apresentam baixos níveis de tais proteínas.^(122,123) Após irradiação de camundongos, foram encontradas mais células em senescência e que as concentrações de Lamin b1 diminuía inversamente ao aumento do número de células definidas como senescentes.⁽¹²⁴⁾

2.3.4 IL-1 β

A interleucina-1 α e a IL-1 β são componentes reconhecidos do SASP,⁽¹²⁵⁾ sendo consideradas as principais proteínas precursoras que se ligam ao IL-1R1. As IL-1 α e - β ativadas iniciam uma cascata de sinalização que leva à translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B, induzindo inúmeros efeitos de imunidade, como produção e secreção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, regulação positiva de moléculas de adesão, aumento na permeabilidade vascular e proliferação de células T efectoras na presença de células T reguladoras.^(126,127) Embora a IL-1 seja um componente secundário do SASP, é responsável por iniciar uma cascata de eventos que leva à secreção de IL-6 e IL-8, ambos componentes principais do SASP.⁽¹²⁸⁾ Foi demonstrado aumento de IL-1 β em fibroblastos senescentes de camundongos ao mesmo tempo da ativação da via p38/MAPK.⁽¹²⁹⁾

A persistência das células ectópicas endometriais na cavidade peritoneal de mulheres com endometriose pode ser associada a um menor potencial apoptótico e menor índice proliferativo em comparação ao endométrio dessas pacientes, indicativo de adesão, proliferação, invasão e sobrevivência dessas células, culminando com a manutenção das lesões. Acreditamos que esse processo possa

estar relacionado com nossa hipótese de aumento de senescência nas lesões de endometriose em comparação ao endométrio.

A senescência celular é um processo irreversível de suspensão da proliferação celular, responsável pelo controle do crescimento celular desenfreado, assim como uma das vias de reparo celular. Células senescentes são resistentes à apoptose e se mantêm ativas sintetizando metabólitos, como citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, quimiocinas e metaloproteinases, recrutando células do sistema imune para o local afetado assim como desencadeando eventos como o estresse oxidativo. Tais metabólitos e eventos têm o potencial de gerar um *feedback* positivo e ativar vias, como a MAPK, cujas respostas são inflamação e senescência.

Altos níveis de citocinas pró inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e fatores de crescimento, tais como TNF- α , IL-1 e IL-6 e marcadores pró inflamatórios foram dosados em mulheres com endometriose, concentrações diferentes daquelas encontradas nas pacientes sem a doença.

Dessa forma, considerando as características da endometriose, como crescimento de tecido ectópico (lesões) na cavidade peritoneal, células resistentes à apoptose, presença de fatores angiogênicos, imunológicos e inflamatórios, altas concentrações de espécies reativas de oxigênio e citocinas inflamatórias, postulamos que exista um acúmulo de células senescentes nas lesões de endometriose e que o estresse oxidativo pode ser uma das vias mais robustas para a ativação das vias de senescência na lesão.

Proteínas associadas à senescência, como o p16^{Ink4a} e IL-1 β , estariam regulando positivamente o bloqueio do ciclo celular, o que favoreceria a manutenção e progressão da doença. Tal situação ajudaria na manutenção de um microambiente inflamatório através do fenótipo secretor associado a senescência (SASP) e das espécies reativas de oxigênio, induzindo o estabelecimento de mais células senescentes nas lesões endometrióticas e, portanto, dificultando o processo de apoptose local.

A concentração de células senescentes nas lesões foi comparada ao endométrio de mulheres com endometriose. Da mesma forma, avaliamos os resultados encontrados no endométrio de mulheres com endometriose comparado ao de mulheres sem endometriose, já que se supõe que haja maior número de células senescentes no endométrio de pacientes com endometriose quando comparado ao endométrio de mulheres sem a doença. Assim, caso haja maiores concentrações de

células senescentes nos tecidos de endometriose, estes poderiam ser influenciados pelos fatores pró inflamatórios secretados no fluido peritoneal e também do microambiente pró inflamatório e pró oxidativo das lesões.

Também propomos neste estudo, colocalizar marcadores de células senescentes em células epiteliais glandulares, tanto de lesão como de endométrio de mulheres com endometriose para verificar se há diferença no padrão de marcação de proteínas relacionadas com a senescência. Analisaremos também o equilíbrio redox nas células endometrióticas para avaliar o aumento do estresse oxidativo que seria um dos gatilhos de ativação da via MAPK, responsável pela senescência celular.

A hipótese do trabalho que há presença de maiores concentrações de marcadores de senescência tanto na lesão quanto no endométrio. Acreditamos existir maiores concentrações de marcadores de senescência nas células estromais de lesões de endometriose em relação ao endométrio da mesma paciente, assim como uma concentração maior no endométrio de mulheres com a doença quando comparado ao endométrio de mulheres sem e que o SASP, estresse oxidativo assim como as vias MAPK estariam aumentadas em pacientes com endometriose.

2.4 Aplicabilidade

Após avaliação do estresse oxidativo, citocinas, proteínas da via MAPK e a presença de biomarcadores de células senescentes nas lesões de pacientes com endometriose, novas abordagens de controle à endometriose podem ser propostas, direcionadas a novos alvos terapêuticos assim como a fisiopatologia da doença.

3 MÉTODOS

3.1 Local do estudo e considerações éticas

Este estudo, desenvolvido entre julho de 2016 a novembro de 2021, faz parte do Programa de Saúde da Mulher do Hospital Israelita Albert Einstein e foi realizado no Laboratório Experimental do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein. O estudo foi aprovado pelo Sistema de Gerenciamento de Pesquisa e Projeto (2650-16), possui Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE 56229916.9.0000.007) e teve apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2018/11042-0). As pacientes foram triadas por um único cirurgião ginecologista (SP) e divididas em dois grupos, com e sem endometriose. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi entregue para todas as pacientes e o material foi coletado após a assinatura do mesmo. A coleta das amostras respeitou os princípios éticos, práticos e de biossegurança estipulados pelo Ministério da Saúde e pelas Comissões de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Israelita Albert Einstein, mencionadas acima. As coletas respeitaram os protocolos técnicos dos hospitais e dos médicos envolvidos.

3.2 Cálculo da amostra

Por tratar-se de um estudo inédito, este trabalho teve como base um estudo piloto transversal exploratório.⁽²⁴⁾ O número de pacientes para os experimentos de imunoistoquímica foi estimado para obtermos diferença a ser detectada de 7,88%, desvio padrão de 5,6%, nível de significância de 5% com poder de teste de 85%. Para as demais avaliações e experimentos foram utilizadas as amostras biológicas restantes para as análises, sendo então um estudo prospectivo exploratório. Para as avaliações de imunoistoquímica, o número determinado foi de 18 pacientes por grupo (endometriose e controle). O número de amostras de fluido peritoneal coletados variou de acordo com a disponibilidade do mesmo em cada cirurgia, considerando que nem sempre há acúmulo de fluido no fundo de saco de Douglas ou o mesmo pode estar contaminado com sangue.⁽¹³⁰⁾

3.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram consideradas para este estudo pacientes submetidas à videolaparoscopia cirúrgica. Para o grupo com endometriose foram consideradas pacientes que obtiveram o diagnóstico histológico comprovado de endometriose e para o grupo controle, a confirmação da ausência de focos de endometriose no momento do procedimento cirúrgico.

Os critérios de inclusão para ambos os grupos foram: idade entre 18 e 50 anos; ciclos menstruais eumenorréicos com o intervalo entre os ciclos variando de 24 a 35 dias⁽¹³¹⁾ não utilização de terapêutica hormonal nos seis meses que antecederem a cirurgia, incluindo análogos de GnRH, progestagênios e contraceptivos hormonais orais.

Foram excluídas do estudo pacientes que apresentaram um ou mais dos seguintes critérios nos últimos três meses que antecederam a laparoscopia: fumantes; presença de hidrossalpinge e pólipos endometriais; *diabetes mellitus* ou outras endocrinopatias, como hipotireoidismo; doenças cardiovasculares; dislipidemia; lúpus eritematoso sistêmico ou outra doença reumatológica; e doenças oncológicas. O uso crônico de anti-inflamatório foi descartado.

A tabela 1 mostra os dados demográficos das pacientes deste estudo, a descrição do IMC, da idade das pacientes por fase de ciclo (secretora e proliferativa) e grupo (controle e endometriose). Importante frisar neste momento, que as avaliações de todas as medidas levaram em consideração o grupo em que a paciente pertencia, sendo 19 pacientes no grupo controle e 27 no grupo endometriose, e também a fase do ciclo menstrual em que elas se encontravam no momento da cirurgia, sendo 21 pacientes na fase secretora e 25 na fase proliferativa, dentre as com endometriose, e 9 na fase secretora e 10 na fase proliferativa dentre as sem a doença. As informações das características sintomatológicas podem ser vistas na tabela 2. Foram coletadas para este trabalho lesões retrocervicais, entretanto durante as cirurgias as pacientes possuíam outros tipos de lesões concomitantes, que estão listadas na tabela 3.

Tabela 1. Caracterização demográfica geral da amostra utilizada para todos os experimentos

Características demográficas	Controle (n=19)		Endometriose (n=27)	
	Secretora (n=9)	Proliferativa (n=10)	Secretora (n=12)	Proliferativa (n=15)
Idade (anos)	41,7 (38,7; 44,9)	38,9 (36,1; 42,0)	35,8 (33,2; 38,5)	35,5 (33,2; 38,0)
IMC (kg/m ²)	29,0 (26,4; 31,7)	24,0 (22,0; 26,2)	23,4 (21,6; 25,3)	22,2 (20,7; 23,9)

IMC: índice de massa corpórea. Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%.

Tabela 2. Dados fenotípicos das pacientes selecionadas

Sintoma	Endometriose n (%)	Controle n (%)
Dismenorreia	24 (89)	11 (56)
Dor pélvica acíclica	14 (52)	4 (19)
Dispareunia	20 (74)	4 (19)
Sintomas intestinais	18 (67)	0 (0)
Sintomas urinários	3 (11)	0 (0)
Infertilidade	0 (0)	1 (6)

Sintomas relatados nas pacientes com endometriose e sem endometriose. Uma paciente pode apresentar mais que um tipo de sintoma.

Tabela 3. Tipos de lesões encontradas nas cirurgias

Tipo de lesão	Total n (%)
Diafragma	1 (4)
Endometrioma	12 (44)
Peritoneal superficial	19 (70)
Periureteral	3 (11)
Retossigmoide	11 (41)
Retrocervical	27 (100)
Vagina	15 (56)

Total de lesões encontradas nas pacientes com endometriose: as lesões utilizadas para este estudo foram as retrocervicais. Uma paciente pode apresentar mais que um tipo de lesão. As lesões retossigmoides são representadas pela soma das lesões intestinais, de reto e no retossigmoide. N=27.

3.4 Dinâmica do estudo

As pacientes do grupo com endometriose foram submetidas à investigação para dor pélvica por meio de anamnese, exame físico e ultrassonografia pélvica e transvaginal com preparo intestinal. Das pacientes avaliadas, aquelas que, após tratamento clínico não apresentaram resultados satisfatórios de melhora do quadro clínico e mantiveram queixa de dismenorreia, dispareunia de profundidade, dor pélvica crônica e/ou alterações intestinais cíclicas, associado à ultrassonografia

indicando a presença de lesões de endometriose profunda, foram encaminhadas para videolaparoscopia. As pacientes submetidas à videolaparoscopia para ressecção das lesões de endometriose profunda, incluindo lesões retrocervicais e nódulos de parede intestinal, seguiram a rotina habitual do serviço. Dentro da rotina, as amostras foram encaminhadas ao Setor de Anatomia Patológica para avaliação da lesão de endometriose profunda e uma parte da amostra foi selecionada para a presente pesquisa. O fluido peritoneal presente em fundo de saco anterior e/ou posterior foi coletado no início da cirurgia para evitar contaminação por sangue. Durante a cirurgia e com o resultado anatomopatológico confirmando a presença ou não da doença, a paciente foi incluída para o grupo de estudo. O endométrio foi coletado logo após o posicionamento da paciente para o procedimento cirúrgico, utilizando-se cureta de *Recamier*.

Para o grupo controle foram selecionadas mulheres submetidas à cirurgia laparoscópica cuja visualização da cavidade peritoneal comprovou a ausência de focos de endometriose. Dentre esses procedimentos, foram incluídas cirurgias para miomectomia e investigação de dor pélvica, cumprindo todos os critérios de inclusão e exclusão determinados nesse estudo. As amostras de fluido peritoneal e endométrio foram coletadas de forma idêntica à descrita para as pacientes com endometriose.

As amostras de fluido peritoneal, endométrio e lesão de endometriose profunda coletadas de todas as pacientes, foram enviadas ao laboratório de pesquisa experimental do Hospital Israelita Albert Einstein e armazenados conforme descrição metodológica abaixo (Figura 3).

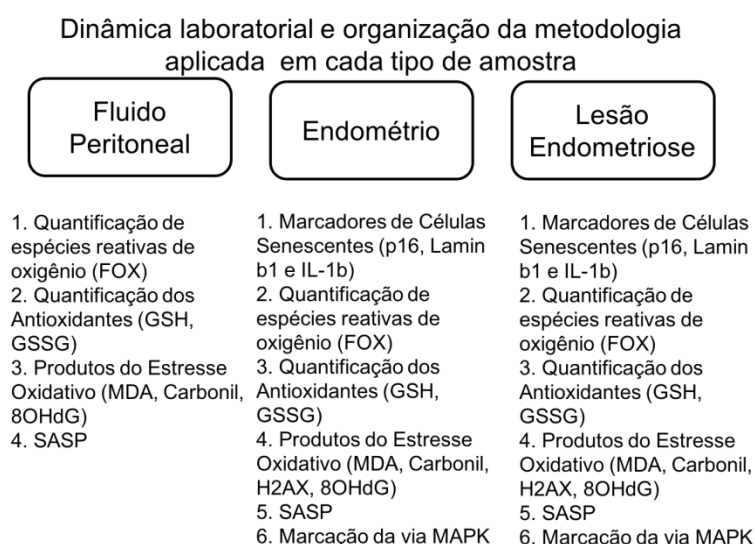
A presença de marcadores de senescência foi avaliada em vários níveis, comparando-se biomarcadores de células senescentes por imunofluorescência para p16^{Ink4a} e Lamin b1 e imunoistoquímica para Lamin b1, p16^{Ink4a}, IL-1 β nos tecidos (endométrio controle, endométrio de paciente com endometriose e lesão de endometriose profunda). O equilíbrio redox foi avaliado tanto nos tecidos quanto no fluido peritoneal nas fases:

1. Geração de espécies reativas, através do total de hidroperóxidos oxidação férrica (FOX – *ferrous oxidation*);
2. Fase intermediária, onde ocorre a resposta antioxidante glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG);

3. O dano oxidativo em lipídeos (malondialdeído), proteína (imunoistoquímica γ -H2AX e carbonil) e DNA [8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8OHdG – *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine*)].

As espécies reativas de oxigênio e de antioxidantes foram quantificadas por espectrofotometria através do cálculo de absorbância. As amostras de fluido peritoneal e tecidos foram avaliados quanto ao fenótipo secretor associado a senescência (SASP) por Luminex MagPix.

Em um segundo momento, foi avaliada a detecção da via MAPK por Luminex MagPix e kit de fosforilação para os seguintes marcadores: MAPK:ERK 1 e 2, JNK 1 e 3, p-38MAPK, MAP2K: MEK1, MSK1, HSP27 e os fatores de transcrição ATF-2, c-Jun, p53 e STAT1.



Esquema da organização dos experimentos laboratoriais. SASP: fenótipo secretor associado à senescência; MAPK: proteíno-quinases ativadas por mitógenos; FOX: oxidação férrica (*ferrous oxidation*); GSH: glutatona reduzida; IL: Interleucina; GSSG: glutatona oxidada; MDA: malondialdeído; H2AX: proteína histona da família H2A; 8OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (*8-hydroxy-2'-deoxyguanosine*).

Figura 3. Dinâmica laboratorial

3.5 Procedimentos laboratoriais

Para esclarecimento das nomenclaturas a seguir, deve-se considerar que endométrio controle (ou somente controle) se refere ao endométrio de pacientes sem endometriose; endométrio eutópico (ou somente eutópico) se refere ao

endométrio de pacientes com endometriose; e lesão se refere às lesões profundas de pacientes com endometriose.

3.5.1 Transporte e armazenamento das amostras

As biópsias obtidas do endométrio eutópico e da lesão, foram imediatamente imersas em gelo durante a cirurgia. No laboratório experimental do Hospital Israelita Albert Einstein as amostras foram separadas entre os experimentos de histologia e estresse oxidativo + citocinas. As amostras separadas para análise histológica foram emblocadas em OCT Tissue Tek (TissueTek® O.C.T., Sakura), enquanto o restante do material foi conservado em criotubo seco. Ambos foram congelados e mantidos em *freezer* a -80°C até a realização dos experimentos. O fluido peritoneal foi coletado em tubo tipo *falcon* cônico (15mL) estéril e mantido em gelo até o final da cirurgia. No laboratório experimental o fluido foi centrifugado durante 10 minutos a 10.000rpm e o sobrenadante selecionado, aliquotado em amostras de 200µL e armazenado a -80°C.

3.5.2 Avaliação da fase do ciclo menstrual

A fase do ciclo menstrual de cada paciente foi caracterizada de acordo com os dias do ciclo menstrual que antecedeu a cirurgia. As fases proliferativa e secretora foram divididas de acordo com a data do início do ciclo menstrual fornecido pela paciente. Os valores de referência consideraram o padrão, fase proliferativa: 0 a 15 dias após a última menstruação e fase secretora: 16 a 35 dias após a data da última menstruação.

3.5.3 Homogenato do tecido para análises de estresse oxidativo, SASP e MAPK

As amostras de endométrio controle, eutópico e de lesão foram pesadas (entre 18 e 22mg), colocadas em um Eppendorf de 1,5mL e cada pesagem determinada e os valores anotados para referência. Nos Eppendorfs foram adicionados 200µL de tampão fosfato e o tecido picotado com tesoura estéril. Foram adicionados

mais 800µL do tampão fosfato e as amostras foram mantidas no gelo e sonicadas por 30 segundos no Vibra-Cell™ Ultrasonic Liquid Processors (SONICS), a uma amplitude de 20%. Após estes procedimentos, todas as amostras foram centrifugadas a 4000rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante separado em alíquotas de 200µL para as futuras análises.

3.5.4 Determinação proteica

A concentração proteica do fluido peritoneal e do tecido foram determinados utilizando-se o kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Brevemente, em uma placa de 96 poços com fundo reto foi adicionado em triplicata, 2,5µL de cada amostra de homogenato do tecido juntamente com 50µL da solução reagente (50 partes da solução A para 1 parte da solução B). A curva foi realizada seguindo a diluição recomendada pelo fabricante (diluições seriadas de concentração de 2000µg/mL e o ponto mínimo 0,0µg/mL) e misturada também a solução A+B. Após completa, a placa foi mantida a 37°C por 30 minutos. As leituras foram no equipamento *Spectramax* (Beckman Coulter DTX880 Multimode Detector) a 540nm. Os resultados foram expressos em µg/µL ou o total de grama pelo volume total de amostra.

3.5.5 Avaliação de marcadores de pró senescência e co-localização: imunoistoquímica para Lamin b1, p16^{Ink4a}, IL-1β

As amostras de tecido que foram previamente preparadas e montadas em lâminas seguiram o mesmo protocolo descrito acima para imunoistoquímica. A proteína Lamin b1 foi localizada utilizando anticorpo policlonal Lamin b1 (H90, catalog no. sc-20682; Santa Cruz Biotechnology) com uma diluição de 1:100; já a proteína p16^{Ink4a} foi localizada com a utilização do anti-p16^{Ink4a} (CINtec p16^{Ink4a} Histology Ventana Roche - 805-4713) na concentração 1,0µg/mL. Avaliamos também a presença de IL-1β utilizando o anticorpo anti-IL-1-β [IL-1β (3A6) Mouse mAb#12242S Cell Signaling, Danvers, MA]. A fotomicrografia foi realizada utilizando um microscópio IX-51.

A técnica de imunoistoquímica foi realizada com o auxílio da Plataforma de Marcação BenchMark ULTRA IHC/ISH – Ventana Medical Systems, do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Israelita Albert Einstein, que dentre suas vantagens estão a redução no tempo de execução da técnica, uniformização nas reações e economia de anticorpos. O kit utilizado para revelação do sinal da marcação foi o UltraView Universal DAB Detection Kit- Ventana Medical Systems que é isento de biotina e utiliza um método indireto para visualizar anticorpos específicos ligados a antígenos. No final de cada etapa, a plataforma utiliza de sucessivas lavagens com solução tampão à base de Tris (*Reaction buffer* pH 7,6), juntamente com uma solução de proteção Ultra Coverslip, composto por moléculas de óleos orgânicos que se espalham pela superfície do tampão criando uma barreira eficaz entre o tampão e o ar evitando a evaporação do conteúdo que está sobre a lâmina, e que ajusta o volume das lâminas mantendo-o constante.

Para a análise quantitativa utilizamos o método da histometria, que se baseia em cortes seriados de mesma espessura (4µm) do bloco da amostra e análise de múltiplas imagens. Foram realizados quatro cortes seriados. Desses cortes, quatro imagens foram capturadas de cada corte, totalizando 16 imagens por tecido. Cada corte foi avaliado com relação a quantidade de marcação da proteína (em marrom) pelo total de área marcada, excluindo os espaços em branco da lâmina. Utilizamos esse critério, pois, alguns tecidos podem conter mais ou menos glândulas, o que aumentaria o espaço não celular em cada um dos cortes alterando a relação entre o total de proteína e o tecido. Utilizamos o microscópio invertido IX51 para visualizar, fotografar e quantificar (análise de histometria) as imagens com o *software* Cell Sens Dimension. Este programa permite-nos selecionar as áreas a serem quantificadas, automaticamente calculadas em µm². Portanto, indicamos as áreas de proteína e as áreas a serem excluídas (em branco).

3.5.6 Avaliação de marcadores de pró senescência e co-localização: imunofluorescência para p16^{Ink4a} e Lamin b1

Co-localização de marcadores por imunofluorescência: este método visa à avaliação proteica em compartimentos celulares específicos (células epiteliais glandulares). Lâminas com tecido previamente cortado em criostato (4µm) foram

incubadas com anticorpos específicos das enzimas relacionadas à senescência celular 1:100 p16^{Ink4a} (ab108349) e 1:50 Lamin b1 (sc-20682) juntamente com anticorpos de marcadores celulares: Anticorpo Anti-ecaderina (Anti-E Cadherin antibody [M168] [ab76055]), que marca especificamente células epiteliais (glandulares). Anticorpo Goat Anti-Mouse IgG H&L [(FITC) (ab6785)] e Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 680) (ab175773) foram utilizados como anticorpos secundários, 1:400. Fotomicrografia foi realizada utilizando um microscópio *Confocal*. Foram fotografados três campos aleatórios para cada tecido.

3.5.7 Geração de espécies reativas de oxigênio

A determinação do total de hidroperóxidos (FOX1) foi adaptada segundo metodologia descrita por Galli.⁽¹³²⁾ Nessa quantificação foram medidas as espécies reativas de oxigênio, tanto no fluido peritoneal, quanto nos três tecidos coletados (controle, eutópico e lesão). O sistema de teste FOX1 é baseado na oxidação do Fe+2 (íon ferroso) a Fe+3 (íon férrico) por vários tipos de peróxidos contidos nas amostras a serem analisadas. Na presença de *xylenol orange* forma-se um complexo colorido (*xylenol orange-férrico*) de cor azul púrpura, cuja absorbância pode ser medida.⁽¹³³⁾ Neste método foi utilizada uma substância preparada no dia da leitura (o reagente FOX1). A solução 1 é preparada com 7,6mg de *xylenol orange* (Sigma Aldrich – 52097-1G) e 88mg de butil-hidroxitolueno (BHT) (Sigma Aldrich – 47168) em 90mL de metanol (Sigma Aldrich – 322415-1L). A solução 2 é preparada com 9,8mg de sulfato ferroso (Sigma Aldrich – F1543) em 10mL de ácido sulfúrico (Sigma Aldrich – 339741-100ML) 250mM (0,13mL de ácido sulfúrico em 10mL de água). As duas soluções foram misturadas em concentração 9:1 no momento da leitura. Para a análise foram adicionados 100µL de fluido peritoneal ou do respectivo homogenato de tecido, 100µL de água (para o branco) e 1mL da solução, que reagiram por 30 minutos ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 3500rpm e a absorbância do sobrenadante em 560nm. A curva foi realizada com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Sigma Aldrich – 95299-1L) em concentrações de 10 a 200µM. O resultado é expresso em nmol/g de proteína para o tecido e µmol/g de proteína para as amostras de fluido peritoneal.

3.5.8 Resposta antioxidante ao acúmulo de ROS intracelular: capacidade antioxidante em tecido

As concentrações das enzimas antioxidantes intracelulares foram medidas através de ensaios de absorbância de GSH e GSSG. Resumidamente, o homogenato dos tecidos foi medido como descrito anteriormente,⁽¹³⁴⁾ em que grupos tiol reagem com o ácido ditionitrobenzóico (DTNB) (Sigma Aldrich - D8130-500MG) para formar um ânion com um pico máximo a 412nm ($\epsilon_{412} = 13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Resumidamente, uma alíquota de 25µL de homogenato de tecido foi misturada com 1mL de tampão TRIS-EDTA (25nmol/L / 1 TRIS-base, 20mmol/L de EDTA, pH 8,2; Sigma Aldrich – T9285-100ML) e a sua absorbância medida a 412nm. A esta solução foram adicionados 25µL de solução estoque de DTNB (10nmol/L em etanol absoluto; Sigma Aldrich – 32205-1L), seguido de incubação à temperatura ambiente por 15 minutos e outra medida de absorbância a 412nm, com DTNB como branco.⁽¹³³⁾ A concentração de grupos sulfidríla foi calculada usando GSH e os resultados registrados como nanomoles por grama de proteína.

3.5.9 Dano oxidativo em lipídeos

Esta análise foi feita de acordo com o método proposto por Erdelmeier et al., com algumas adaptações.⁽¹³⁵⁾ Do homogenato do tecido e do fluido peritoneal foram retirados 200µL e transferidos a um Eppendorf onde foi adicionado 650µL de solução de 10mM de 1-metil-fenilindol (Sigma Aldrich – 404888-10G) em acetonitrila (Sigma Aldrich – 34851-1L) e metanol (2:1, v/v) e 150µL de ácido clorídrico (Sigma Aldrich – 320331-500ML) puro (37%). Logo após, os Eppendorfs foram agitados em vórtex e incubados em banho-maria a 45°C por 40 minutos. Após o banho, houve resfriamento das amostras em gelo e em seguida centrifugadas a 4000rpm por 10 minutos. Do sobrenadante foi feita a leitura de absorbância com comprimento de onda de 586nm. A concentração de MDA foi calculada comparando-a a uma curva de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) (Sigma Aldrich – 108383-100ML) hidrolisado.

3.5.10 Dano oxidativo em proteínas – carbonil

Foi separado em Eppendorf de 1,5mL, 100µL de amostras de fluido peritoneal e do homogenato do tecido. Em todos os tubos foram adicionados 100µL de ácido tricloroacético (Sigma Aldrich – T6399-5G), vortexados e centrifugados por 10 minutos a 3500rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionados 500µL de 2,4 dinitrofenilhidrazina (Sigma Aldrich - D199303-25G). As amostras foram colocadas no escuro por 1 hora, sendo agitadas a cada 15 minutos. Após a incubação, as amostras foram lavadas 3 vezes com a mistura etanol/acetato de etila (Sigma Aldrich – 270989-100ML) (v:v), vortexando e centrifugando a 3500rpm por 10 minutos a 4°C. Após a lavagem, os pellets foram dissolvidos com hidróxido de sódio 1M (Sigma Aldrich – S8045-500G), em banho maria a 34°C por 15 minutos. Foram adicionados 200µL de cada amostra em uma placa de 96 poços com fundo reto e lidas a 360-390nm. Para o cálculo de concentração de carbonil foi utilizada a seguinte equação:⁽¹³⁶⁾

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

onde A = absorbância; ϵ = coeficiente de extinção molar do carbonil; b = passo óptico (0,5cm pelos 200µL adicionados na placa) e C a concentração expressa.

3.5.11 Dano oxidativo em DNA – por imunistoquímica gama-H2A (γ -H2AX)

As amostras de tecido que foram previamente preparadas e montadas em lâminas de acordo com o descrito no item 3.5.5. O γ -H2AX foi localizado usando o anticorpo anti-gama H2AX (ab22551; Abcam) com uma diluição de 1:1000.

3.5.12 Dano oxidativo em DNA – 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

A determinação e a quantificação da 8OHdG foi realizada pelo método de ELISA (Stressgen® DNA Damage ELISA Kit, Ann Arbor, MI), de acordo com as recomendações do fabricante. A curva de calibração foi determinada com o padrão conhecido de 8OHdG nas concentrações de 0,94 a 10ng/mL. Para o procedimento,

foram realizados dois experimentos separadamente. O primeiro para avaliar 8OHdG no fluido peritoneal e o segundo para avaliar 8OHdG no tecido. Brevemente em uma placa previamente sensibilizada com anticorpos anti-8OHdG, adicionou-se 50µL de fluido peritoneal ou 10ng de DNA (solução final de 24µL) e dos padrões em cada poço, fez-se uma primeira lavagem da placa e a seguir foi adicionado 50µL de anticorpo anti-8OHdG [Anti-8 *Hydroxyguanosine antibody* (ab10802)] previamente diluído em cada poço, exceto no branco. Após incubação à temperatura ambiente por uma hora, foram realizadas seis lavagens da placa com solução tampão utilizando-se a lavadora de microplacas automática (BIO-RAD). Adicionou-se 100µL do substrato TMB em cada poço, deixando incubar por 30 minutos no escuro e por fim foram adicionados 100µL da solução de parada (STOP solution, Stressgen® DNA Damage ELISA Kit, Ann Arbor, MI). Foi detectada uma cor amarela, que é inversamente proporcional à concentração de 8OHdG expressa em ng/mL. A leitura foi realizada em absorbância de 450nm no equipamento e *software* Glow Max Discovery (Promega).

3.5.13 Produtos do resultado de processos inflamatórios no tecido da lesão

O fluido peritoneal e o tecido homogeneizado foram avaliados quanto à presença e quantificação de citocinas por meio de ensaio Imunológico Multiplex, com sistema de *beads* magnéticas, utilizando o kit HCYTOMAG-60K MILLIPLEX MAP *Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel – Immunology Multiplex Assay*. A leitura foi realizada em aparelho Milliplex Map (Merck Millipore®). Esse painel é composto pelas seguintes citocinas: EGF, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IL-17A, TGF-α, TNF-α, TNF-β, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Brevemente, 25µL das amostras, curva padrão e branco foram adicionados em placa de 96 poços segundo recomendações do fabricante. Em cada poço foi adicionado 25µL do Assay Buffer e 25µL das *beads* magnéticas (anticorpos). Essa placa foi incubada a 4°C *overnight*. No segundo dia, após 3 lavagens com a solução de lavagem fornecida no kit, adicionou-se 25µL da solução de detecção de anticorpo juntamente com 25µL de streptavidin *phycoerythrin* (para detecção pelo aparelho). A placa foi incubada por 1 hora e então, lida no Luminex®200™ utilizando o *software* MAGPIX® para leitura e o *Analyst* para interpretação dos dados.

3.5.14 Proteínas da via MAPK (ERK1/2, JNK, P38, ATF2, c-Jun, p53, STAT1, MEK1, MSK1, HSP27)

O tecido homogeneizado foi avaliado quanto à presença e quantificação das principais proteínas envolvidas na via MAPK meio de ensaio Imunológico Multiplex, com sistema de *beads* magnéticas, utilizando o kit MAPK/SAPK Signaling 10-plex Magnetic Bead Kit 96-well Plate (cat # 48-660MAG, Merck Millipore®). A leitura foi realizada em aparelho Millipex Map (Merck Millipore®). Esse painel é composto pelas seguintes proteínas: ERK1/2, JNK, P38, ATF2, c-Jun, p53, STAT1, MEK1, MSK1, HSP27. Brevemente 25µL das amostras, curva padrão e branco foram adicionados na placa de 96 poços conforme instruções do kit. Em cada poço, adicionou-se 25µL do Assay Buffer e 25µL das *beads* magnéticas (anticorpos). Essa placa foi incubada a 4°C *overnight*. No segundo dia, após 3 lavagens com a solução de lavagem do Kit, foi adicionado 25µL da solução de detecção de anticorpo. A placa foi incubada por 1 hora, os anticorpos de detecção removidos e adicionado 25µL de *streptavidin phycoerythrin* (SAPE) para detecção pelo aparelho Millipex Map e incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro em agitação. Após 15 minutos, à solução SAPE foi adicionado 25µL de *Buffer* de amplificação. A placa foi mantida por 15 minutos nessa solução. A solução foi retirada e 150µL de Assay Buffer foi acrescentado para leitura da placa. A leitura foi realizada no Luminex®200™, utilizando o *software* MAGPIX® para leitura e o Analyst para interpretação dos dados.

3.6 Análise e interpretação dos dados

As variáveis quantitativas foram descritas por meio de mediana e intervalo interquartil (IIQ), pois não possuíam distribuição normal (de acordo com o teste Shapiro Wilk). As variáveis qualitativas foram descritas por frequência absoluta e porcentagem.⁽¹³⁷⁾

As comparações entre grupos (controle, eutópico e lesão) e fases do ciclo (proliferativa e secretora), assim como a investigação da relação entre variáveis de interesse, foi realizada por modelos lineares generalizados da família gama (com valores iguais a zero substituídos por 10 vezes o menor valor obtido, de modo a possibilitar ajuste) e função de ligação log, mistos ou não. A interpretação do modelo

se deu pela razão de médias (RM) das medidas, ou seja, valores maiores do que um indicam que a média da categoria de interesse é maior em relação à categoria de referência (que para este trabalho foram consideradas duas possibilidades: endométrio eutópico na fase secretora ou endométrio eutópico na fase proliferativa); e valores menores do que um indicam que a média da categoria de interesse é menor em relação à categoria de referência. As análises realizadas com as medidas do fluido peritoneal consideraram como referência o grupo controle na fase secretora.

Além de grupo e fase de ciclo, foi testada a interação entre as duas variáveis. A significância da interação indica haver um comportamento distinto entre os grupos na fase secretora e proliferativa. Para a interação consideramos como referência o grupo eutópico na fase secretora.

Os modelos mistos contemplaram a dependência entre as medidas de uma mesma mulher (foram avaliadas 16 imagens de cada paciente para cada proteína) e as medidas dentro do mesmo grupo (controle, eutópico e lesão) em diferentes fases (proliferativa e secretora).⁽¹³⁸⁾

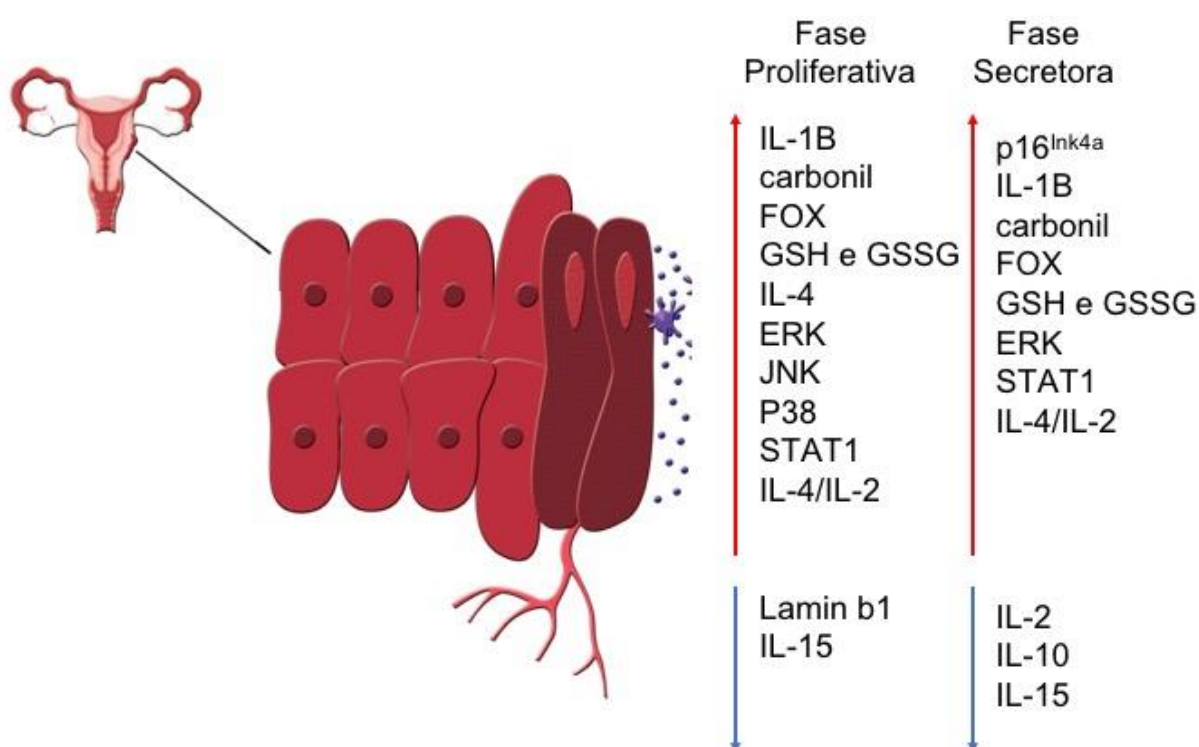
Como as medidas de expressão de proteína (IL-1, p16^{Ink4a} e Lamin b1) são marcadores de envelhecimento, foi investigada a relação dessas medidas com a idade e o índice de massa corpórea (IMC). Nessa análise consideramos a média das medidas de expressão de proteínas da mesma mulher e, foram usados modelos lineares generalizados de família gama com função de ligação log.

As análises foram realizadas com o pacote estatístico R (R Core Team, 2017). O nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Principais achados

Nossos resultados mostraram que, a lesão apresenta em comparação ao endométrio eutópico na fase secretora aumento na expressão proteica de p16^{Ink4a}, IL-1 β , maior concentração de carbonil, FOX, GSH e GSSH, diminuição de IL-2, IL-10 e IL15 e por fim expressão de ERK e STAT1 aumentadas. Na fase proliferativa a lesão mostrou ter maior expressão de proteica de IL-1 β e diminuição de Lamin b1, maior concentração de carbonil, FOX, GSH e GSSG, aumento de IL-4 e diminuição de IL-15 finalizando com expressão de ERK, JNK, p38 e STAT1 também aumentadas em comparação ao endométrio eutópico na mesma fase (Figura 4).



Representação das células da lesão (em destaque) e o endométrio eutópico da mesma paciente. Os marcadores com a seta vermelha (e com seta azul) indicam que na lesão houve um aumento (diminuição) em relação ao endométrio eutópico. IL: Interleucina; FOX: oxidação férrica (*ferrous oxidation*); GSH: glutathiona reduzida; GSSG: glutathiona oxidada; ERK: *extracellular signal-regulated kinases*; JNK: *c-Jun NH2-terminal kinase*; STAT1: fator transdutor de sinal e ativador de transcrição 1.

Figura 4. Representação dos principais achados na lesão em relação ao endométrio eutópico para os marcadores analisados de senescência, estresse oxidativo, SASP e MAPK

Ao final de cada bloco de resultados será possível observar o resumo dos principais achados. As análises das comparações por modelos lineares generalizados, mistos ou não, foram descritas em porcentagem para resultados que atingissem de 0 a 100% de aumento ou diminuição e resultados superiores a 100%, a descrição foi feita de acordo com o número de vezes que aumentou ou diminuiu em relação ao grupo de referência. Todos os resultados com $p < 0,05$ estarão destacados em negrito.

4.2 Caracterização das amostras

Coletamos 27 lesões e 27 endométrios das pacientes com endometriose e 19 endométrios controle. As biópsias coletadas foram divididas entre análises de imunoistoquímica/imunofluorescência, análises de estresse oxidativo, citocinas, MAPK e dosagem de 8OhdG. Biópsias com restrição de tamanho foram somente utilizadas para os experimentos de imunoistoquímica, as demais divididas entre todos os outros experimentos. Como a coleta do fluido peritoneal é dependente da ausência de sangue e também disponibilidade, foi possível coletar 15 fluidos de pacientes controle e 26 fluidos peritoneais de pacientes com endometriose. É possível verificar o número de amostras utilizadas em cada experimento nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Organização dos experimentos e número de pacientes por etapa dentro do grupo endometriose

Experimentos	Endometriose					
	Fase proliferativa			Fase secretora		
	Lesão	Endométrio	Fluido peritoneal	Lesão	Endométrio	Fluido peritoneal
Imunoistoquímica p16 ^{Ink4a}	15	13	-	12	12	-
Imunoistoquímica Lamin b1	15	13	-	12	11	-
Imunoistoquímica IL-1 β	14	12	-	11	10	-
Imunoistoquímica H2AX	15	13	-	12	11	-
Estresse oxidativo FOX	8	8	13	12	11	11
Estresse oxidativo MDA	8	8	13	12	11	11
Estresse oxidativo carbonil	8	8	13	12	11	11
Estresse oxidativo GSH	8	8	-	12	11	-
Estresse oxidativo GSSG	8	8	-	12	11	-
Citocinas	8	8	13	12	11	11
MAPK	8	8	13	12	11	11
8OhdG	7	2	13	6	7	11

Número de pacientes coletadas e utilizadas em cada experimento no grupo endometriose e em cada fase do ciclo. As células vazias são experimentos que não foram realizados. IL: Interleucina; MDA: Malondialdeído; FOX: *xyleneol orange*-férico; GSH: glutationa reduzida; GSSG: glutationa oxidada; MAPK: proteínas quinases ativada por mitógeno; 8OhdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina; H2AX: proteína histona da família H2A.

Tabela 5. Organização dos experimentos e número de pacientes por etapa dentro do grupo controle

Experimentos	Controle			
	Fase proliferativa		Fase secretora	
	Endométrio	Fluido peritoneal	Endométrio	Fluido peritoneal
Imunoistoquímica p16 ^{Ink4a}	9	-	9	-
Imunoistoquímica Lamin b1	9	-	9	-
Imunoistoquímica IL-1 β	9	-	9	-
Imunoistoquímica H2AX	9	-	9	-
Estresse oxidativo FOX	7	7	9	8
Estresse oxidativo MDA	7	7	9	8
Estresse oxidativo carbonil	7	7	9	8
Estresse oxidativo GSH	7	-	9	-
Estresse oxidativo GSSG	7	-	9	-
Citocinas	7	7	9	8
MAPK	7	7	9	8
8OhdG	6	7	7	8

Número de pacientes coletadas e utilizadas em cada experimento no grupo controle e em cada fase do ciclo. As células vazias são experimentos que não serão realizados. IL: Interleucina; MDA: Malondialdeído; FOX: *xylenol orange*-ferrico; GSH: glutationa reduzida; GSSG: glutationa oxidada; 8OhdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina; H2AX: proteína histona da família H2A; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno.

4.2.1 Comparação entre grupos controle e endometriose separados por fase de ciclo

Avaliamos se o IMC e a idade poderiam ser considerados variáveis influenciadoras nos resultados. Separando os grupos (controle e endometriose) por fase (secretora e proliferativa) observamos diferença na fase secretora em relação ao IMC ($p=0,004$) e à idade ($p=0,023$). Não foi encontrada evidência de diferença entre os grupos na fase proliferativa.

4.2.2 Comparação entre fases de ciclo separadas por grupo

Encontramos diferença entre as pacientes do grupo controle nas diferentes fases do ciclo em relação ao IMC ($p=0,015$). Não foi encontrada evidência de diferença entre as fases no grupo com endometriose.

4.2.3 Relação entre idade, IMC e marcadores de senescência (p16^{Ink4a}, Lamin b1 e IL-1 β)

Existe uma relação entre senescência celular, idade⁽¹³⁹⁾ e IMC.⁽¹⁴⁰⁾ Considerando as diferenças encontradas entre os grupos (controle e endometriose) e as fases do ciclo (proliferativa e secretora) com relação a idade e o IMC, estes foram considerados possíveis fatores explicativos do comportamento das variáveis medidas nos tecidos e fluido peritoneal, e por isso foram incluídos nos modelos estatísticos para as avaliações e comparações.

A idade e o IMC são significativamente diferentes entre os grupos, desta forma avaliamos se isto poderia ter influência nos marcadores de senescência, que é o objetivo principal do trabalho. Para os três marcadores avaliados, IL-1 β , p16^{Ink4a} e Lamin b1, tanto a idade quanto o IMC não apresentaram ter influência significativa (valores-p acima de 0,05) (Tabela 6).

Tabela 6. Relação entre as medidas de expressão de proteínas com idade e IMC

Expressão de proteínas	RM (IC 95%)	Valor-p
IL-1 β		
Idade (anos)	0,98 (0,93; 1,03)	0,436
Índice de massa corpórea (kg/m ²)	1,02 (0,96; 1,08)	0,618
p16 ^{Ink4a}		
Idade (anos)	0,97 (0,92; 1,02)	0,223
Índice de massa corpórea (kg/m ²)	1,02 (0,96; 1,08)	0,493
Lamin b1		
Idade (anos)	1,00 (0,97; 1,04)	0,893
Índice de massa corpórea (kg/m ²)	0,99 (0,94; 1,06)	0,841

RM: razão de médias. IC: intervalo de confiança. IL: interleucina.

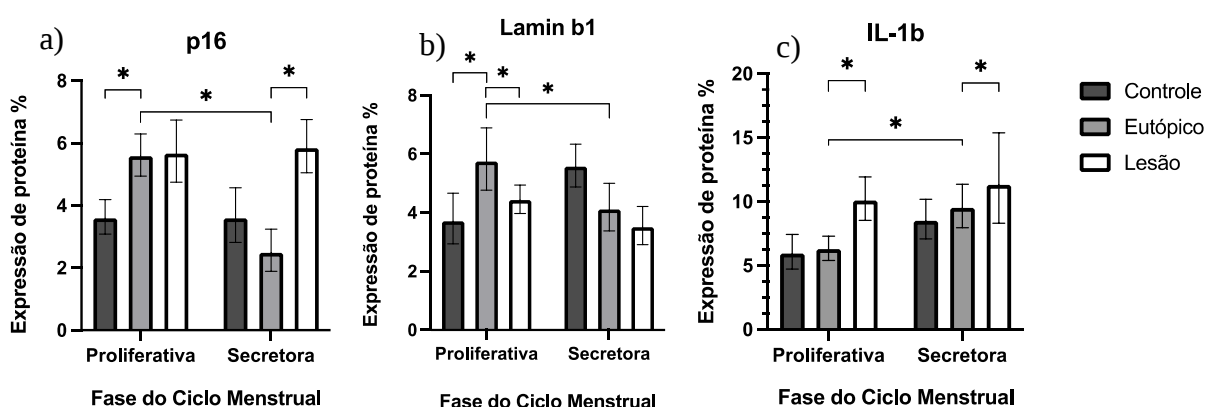
4.3 Comparação entre grupos

Para avaliar as diferenças entre marcadores de senescência celular, estresse oxidativo, citocinas e via MAPK optamos por relacionar os resultados das lesões com os resultados do endométrio eutópico (amostras pareadas), da mesma forma que realizamos as comparações entre endométrios (eutópico X controle). Dessa forma, nossa abordagem visou encontrar diferenças entre o mesmo tecido em condições distintas (eutópico e controle), com a intenção de entender o comportamento do endométrio eutópico e verificar se existem diferenças que possam influenciar no

aparecimento das lesões. Ao compararmos tecidos em sítios distintos (eutópico e lesão), tivemos o objetivo de avaliar o comportamento dos mesmos marcadores controlados por fase do ciclo menstrual, com o intuito de encontrar também comportamentos diferentes que sugerissem um modo de crescimento e ação distinto das células nas lesões comparado ao endométrio eutópico.

4.4 Verificação da presença de marcadores de células senescentes: imunoistoquímica

Consideramos para essa análise as proteínas $p16^{Ink4a}$, Lamin b1 e IL-1 β . Na figura 5 foi criada uma representação gráfica das médias e intervalos de confiança das três proteínas avaliadas, nos diferentes tecidos em ambas as fases do ciclo menstrual.



Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95% (IC 95%). A) expressão de $p16^{Ink4a}$; b) expressão de Lamin b1; c) expressão de IL-1 β * $p < 0,05$. IL: Interleucina.

Figura 5. Expressão de $p16^{Ink4a}$, Lamin b1 e IL-1 β nos diferentes tecidos (controle, eutópico e lesão) em ambas as fases do ciclo menstrual (proliferativa e secretora)

A tabela 7 apresenta a descrição das medianas e o intervalo interquartil das 16 medidas por mulher, para as três variáveis relacionadas à expressão de proteínas marcadores de senescência no tecido ($p16^{Ink4a}$, Lamin b1 e IL-1 β).

Tabela 7. Descrição das médias de expressão de proteínas (IL-1 β , p16^{Ink4a} e Lamin b1) em pacientes com e sem endometriose nas duas fases do ciclo menstrual (fase secretora e proliferativa)

Proteínas	Eutópico		Controle		Lesão	
	Fase		Fase		Fase	
	Secretora	Proliferativa	Secretora	Proliferativa	Secretora	Proliferativa
IL-1 β (%)	9,5 (8,0; 11,4)	6,3 (5,4; 7,3)	8,5 (7,1; 10,2)	5,9 (4,7; 7,4)	11,3 (8,3; 15,4)	10,1 (8,5; 11,9)
p16 ^{Ink4a} (%)	2,5 (1,9; 3,2)	5,6 (5,0; 6,3)	3,6 (2,9; 4,6)	3,6 (3,1; 4,2)	5,8 (5,1; 6,8)	5,7 (4,8; 6,7)
Lamin b1(%)	4,1 (3,4; 5,0)	5,7 (4,8; 6,8)	5,6 (4,9; 6,3)	3,7 (2,9; 4,7)	3,5 (2,9; 4,2)	4,4 (4,0; 4,9)

Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%. IL: Interleucina.

Na tabela 8 é possível observar as razões de médias entre cada uma das proteínas (IL-1 β , p16^{Ink4a} e Lamin b1) avaliadas controlando por grupo e fase do ciclo menstrual, sempre em comparação com o grupo de referência, sendo para Secretora o grupo de referência: endométrio eutópico na fase secretora e para Proliferativa o grupo de referência: endométrio eutópico na fase proliferativa.

Tabela 8. Relações das expressões de proteínas (IL-1 β , p16^{Ink4a} e Lamin b1) em tecido (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)

Expressão de proteínas	Fase secretora		Fase proliferativa	
	RM (IC 95%)	Valor-p	RM (IC 95%)	Valor-p
IL-1 β				
Controle	0,89 (0,67; 1,16)	0,426	1,04 (0,80; 1,36)	0,763
Lesão	1,60 (1,21; 2,12)	0,001	1,72 (1,36; 2,18)	<0,001
p16 ^{Ink4a}				
Controle	1,16 (0,89; 1,52)	0,284	0,65 (0,50; 0,85)	0,002
Lesão	1,57 (1,21; 2,04)	0,001	1,18 (0,94; 1,49)	0,154
Lamin b1				
Controle	1,14 (0,90; 1,44)	0,286	0,65 (0,51; 0,82)	<0,001
Lesão	0,82 (0,65; 1,03)	0,084	0,64 (0,52; 0,79)	<0,001

RM: razão de médias; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; Categorias de referência secretora: tecido eutópico, fase secretora e tecido eutópico x fase secretora. Categorias de referência proliferativa: tecido eutópico, fase proliferativa e tecido eutópico x fase proliferativa. IL: Interleucina.

4.4.1 Avaliação da concentração p16^{Ink4a}

Considerando as informações descritas acima, na figura 5 e Tabela 8 e complementando com as imagens observadas na figura 6, nossos resultados mostraram que a média de p16^{Ink4a} (p=0,001) nas lesões na fase secretora é 57% maior que o grupo de referência (eutópico na fase secretora).

O grupo controle na fase proliferativa possui uma média 35% (p=0,002) menor em relação ao grupo de referência (endométrio eutópico na fase

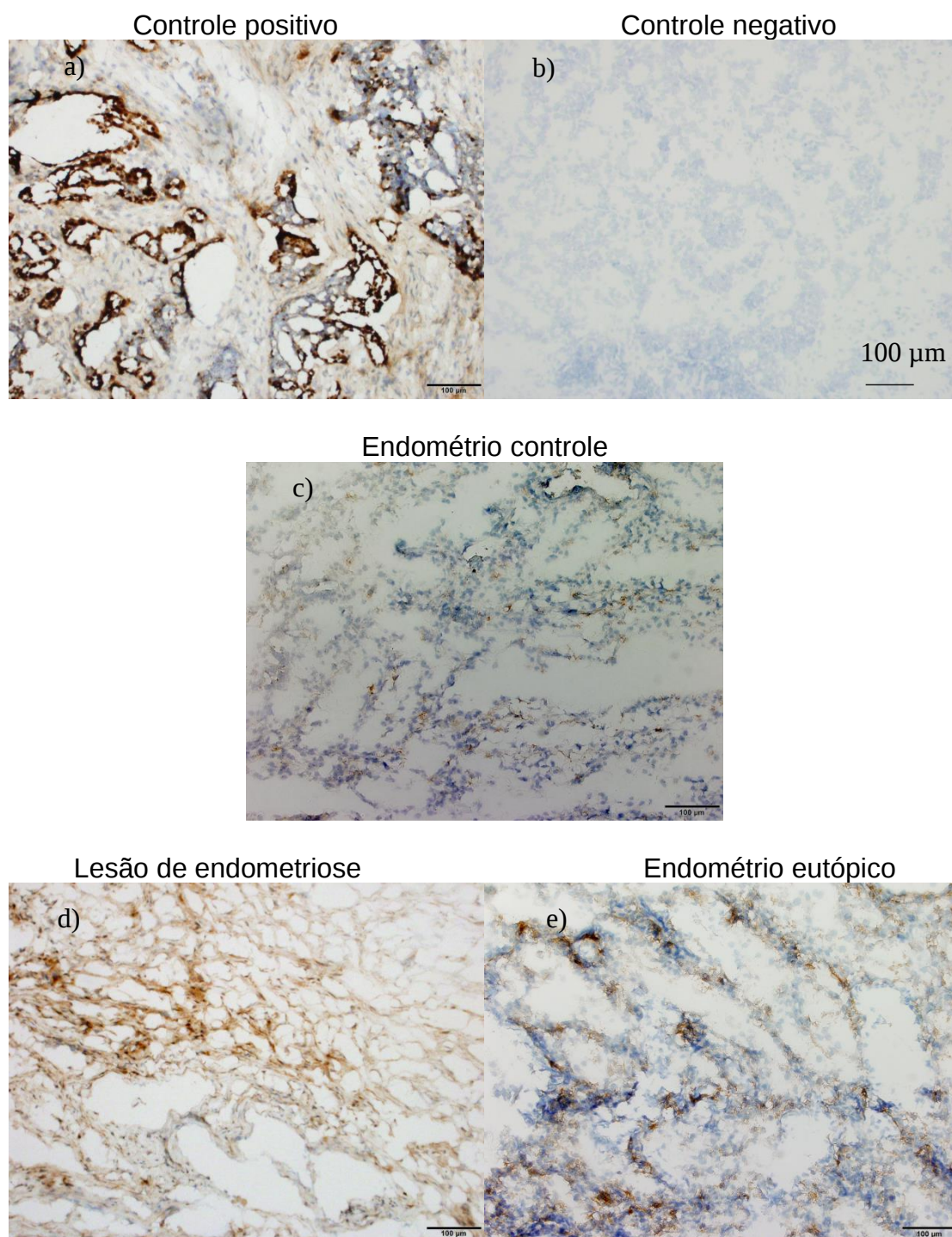
proliferativa). Não encontramos diferença na fase proliferativa entre lesão e endométrio eutópico.

4.4.2 Avaliação da concentração de Lamin b1

Observam-se na figura 7, as imagens representativas de todos os tecidos analisados para Lamin b1. Considerando as informações descritas nas figuras 5 e 7 e Tabela 8, nossos resultados mostraram o grupo lesão na fase proliferativa tem sua média 36% menor ($p < 0,001$) e o controle na fase proliferativa tem a média 35% ($p < 0,001$) menor relação ao grupo de referência (endométrio eutópico na fase proliferativa).

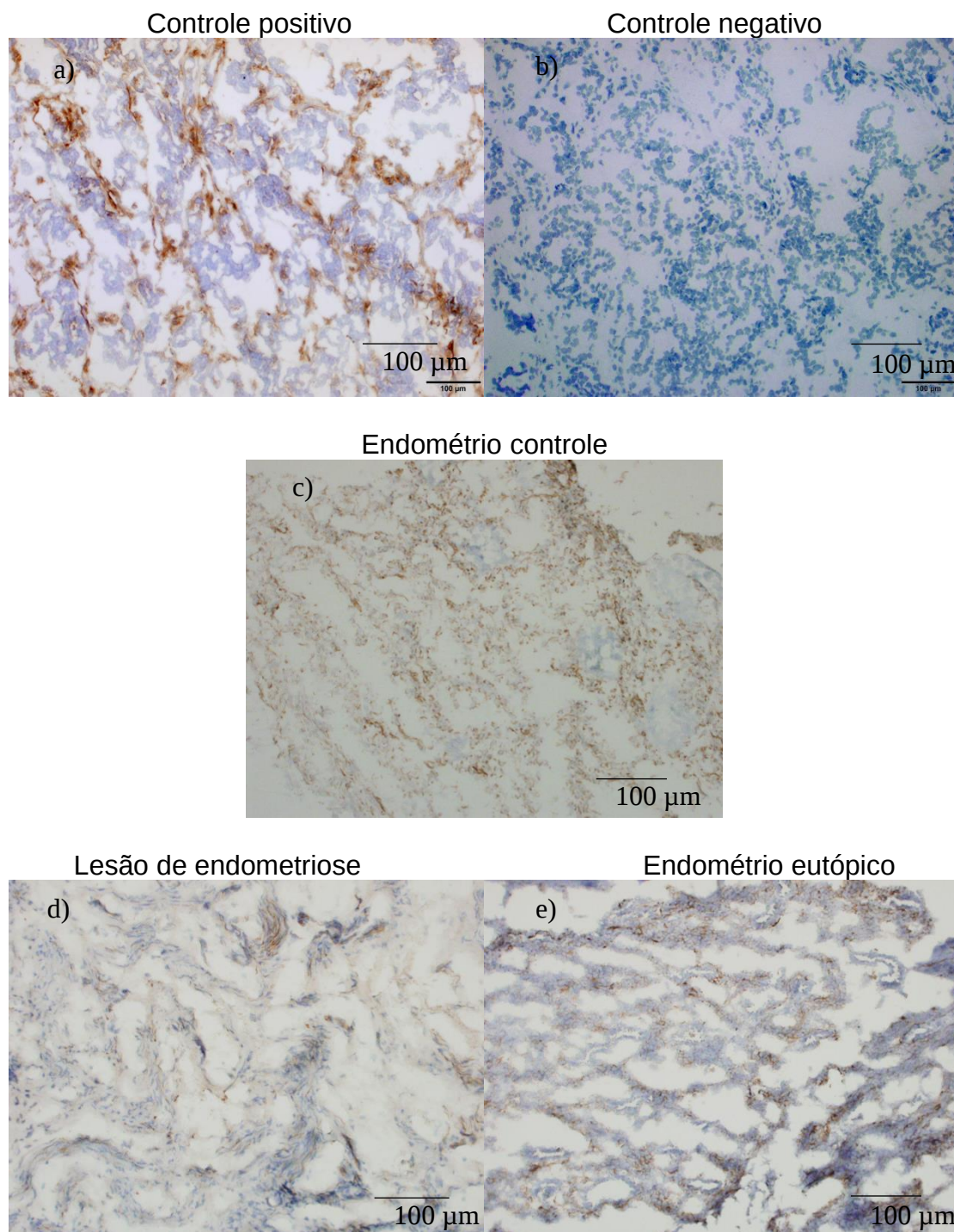
4.4.3 Avaliação da concentração de IL-1 β

O grupo lesão na fase secretora (Tabela 8) teve sua média 60% ($p = 0,001$) maior e na fase proliferativa 72% ($p < 0,001$) maior em relação ao grupo de referência. Observamos, portanto, um aumento na expressão de IL-1 β na lesão em relação ao endométrio eutópico em ambas as fases do ciclo (Figuras 5 e 8).



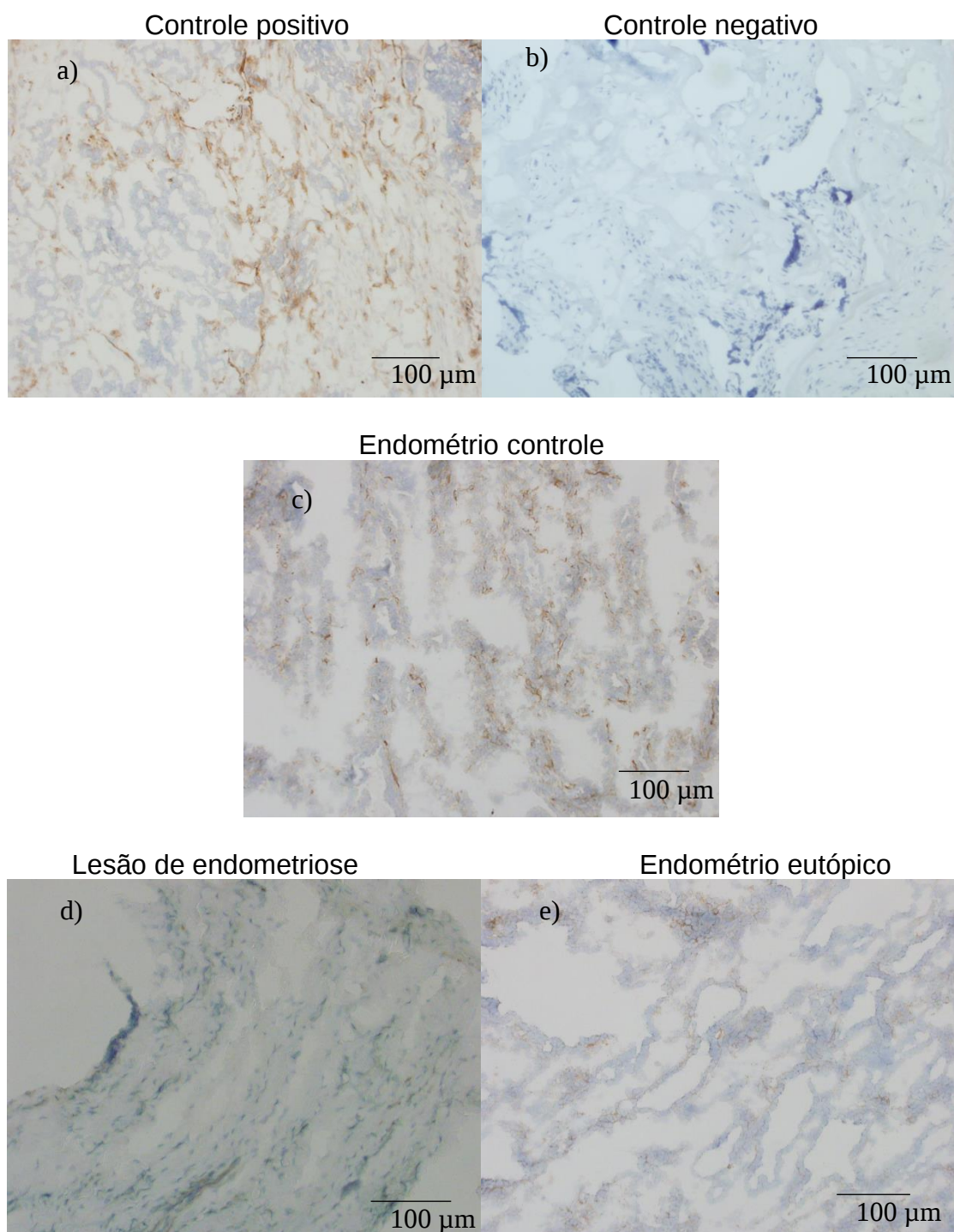
Representação da marcação pela proteína p16^{Ink4a} nos tecidos de endometriose e controles. A cor marrom representa a marcação pelo anticorpo p16^{Ink4a}, a cor azul marca os núcleos celulares e os espaços em branco foram desconsiderados nas análises quantitativas. a) ovário, controle positivo da reação; b) ovário, controle negativo da reação; c) endométrio controle; d) lesão; e) endométrio eutópico. Imagens em 20x.

Figura 6. Imunoistoquímica para p16^{Ink4a}



Representação da marcação pela proteína Lamin b1 nos tecidos de endometriose e controles. A cor marrom representa a marcação pelo anticorpo LAMIN B1, a cor azul marca os núcleos celulares e os espaços em branco foram desconsiderados nas análises quantitativas. a) ovário, controle positivo da reação; b) ovário, controle negativo da reação; c) endométrio controle; d) lesão; e) endométrio eutópico. Imagens em 20x.

Figura 7. Imunoistoquímica para Lamin b1



Representação da marcação pela proteína Interleucina-1 β (IL-1 β) nos tecidos de endometriose e controles. A cor marrom representa a marcação pelo anticorpo IL-1 β , a cor azul marca os núcleos celulares e os espaços em branco foram desconsiderados nas análises quantitativas. a) ovário, controle positivo da reação; b) ovário, controle negativo da reação; c) endométrio controle; d) lesão; e) endométrio eutópico. Imagens em 20x.

Figura 8. Imunoistoquímica para a proteína IL-1 β

4.4.4 Resumo dos resultados da expressão proteica para marcadores de células senescentes

A tabela 9 faz um resumo dos principais achados para expressão de marcadores associados à senescência. Observa-se os resultados entre os 3 diferentes tecidos na fase secretora e os grupos estão na fase proliferativa.

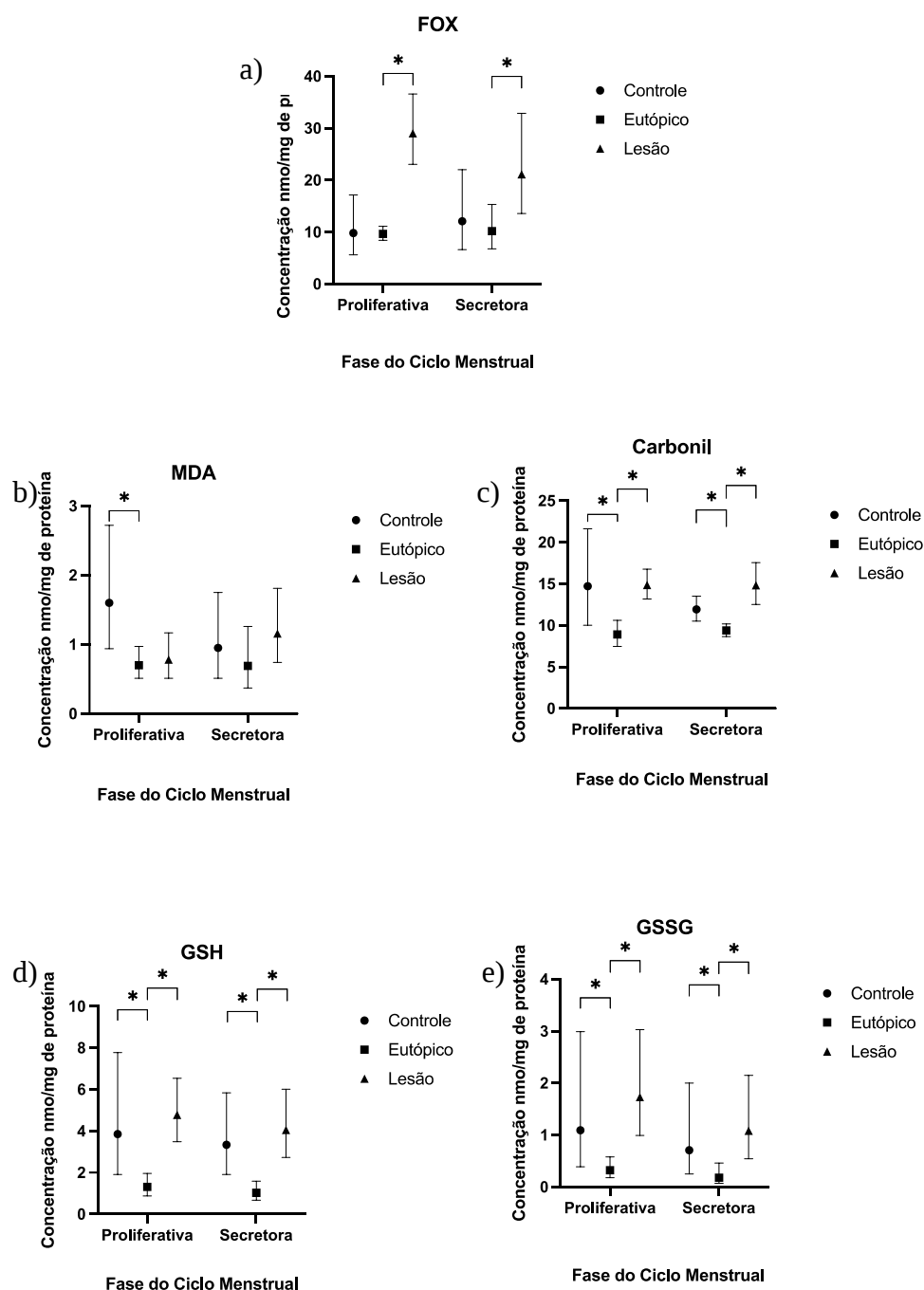
Tabela 9. Resumo dos principais achados para as médias estimadas das proteínas p16^{Ink4a}, IL-1 β e Lamin b1 na comparação da lesão com endométrio eutópico e controle com endométrio eutópico todos nas fases secretora e proliferativa

Proteínas	Fase secretora		Fase proliferativa	
	Controle-secretora	Lesão-secretora	Controle-proliferativa	Lesão-proliferativa
p16 ^{Ink4a}	≈	>	<	≈
IL-1 β	≈	>	≈	>
Lamin b1	≈	≈	<	<

Comparação da expressão proteica nos tecidos, tendo como referência o grupo eutópico na fase secretora ou o grupo eutópico na fase proliferativa. Endométrio controle X endométrio eutópico; lesão X endométrio eutópico. Os resultados com os símbolos "<" e ">" possuem p <0,05. IL: Interleucina.

4.5 Avaliação do estresse oxidativo

Para avaliar o impacto do estresse oxidativo nas lesões de endometriose foi necessário, inicialmente, medir o balanço redox nos tecidos e fluidos das pacientes com e sem endometriose. Para isso realizamos uma série de experimentos de espectrofotometria, com a intenção de medir as concentrações de antioxidantes, produtos do estresse oxidativo e geração de espécies reativas de oxigênio. Com o conjunto de resultados podemos avaliar a geração de estresse oxidativo local, nas biópsias e no fluido peritoneal, que está em íntimo contato com as células do peritônio (Figura 9).



Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%. Concentração de a) FOX; b) MDA; c) carbonil; d) GSH; e) GSSG * $p < 0,05$. MDA: malondialdeído; FOX: *xylenol orange*-férico, GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada.

Figura 9. Variações das concentrações dos marcadores de estresse oxidativo (FOX, MDA, carbonil, GSH e GSSG) em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) e fase do ciclo menstrual (fase secretora e proliferativa) tomadas no tecido de pacientes com e sem endometriose

Realizamos comparações entre os grupos e as fases do ciclo com relação ao grupo de referência (eutópico na fase secretora), para os produtos de estresse oxidativo (carbonil, FOX e MDA), e avaliamos duas moléculas do complexo de

antioxidantes glutatona (GSH e GSSG) dosadas nos tecidos. Além disso, fizemos as mesmas comparações considerando como grupo de referência o endométrio eutópico na fase proliferativa. As médias e intervalos de confiança de todas as dosagens estão na tabela 10.

Tabela 10. Concentrações de marcadores de estresse oxidativo em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)

Marcadores de estresse oxidativo (nmol/mg de proteína)	Eutópico		Controle		Lesão	
	Secretora (x10 ²)	Proliferativa (x10 ²)	Secretora (x10 ²)	Proliferativa (x10 ²)	Secretora (x10 ²)	Proliferativa (x10 ²)
FOX	4,7 (3,3; 6,7)	5,0 (4,3; 5,8)	4,7 (2,8; 7,8)	4,5 (2,9; 7,0)	6,8 (4,9; 9,5)	8,6 (6,9; 10,7)
MDA	0,4 (0,2; 0,6)	0,4 (0,3; 0,5)	0,4 (0,2; 0,8)	0,7 (0,4; 1,3)	0,4 (0,2; 0,6)	0,2 (0,2; 0,3)
carbonil	4,5 (4,2; 4,7)	4,2 (3,9; 4,7)	4,7 (4,3; 5,1)	5,2 (4,5; 6,0)	4,2 (4,0; 4,4)	4,3 (4,1; 5,0)
GSH	0,7 (0,4; 1,2)	0,7 (0,4; 1,1)	1,3 (1,0; 2,1)	1,4 (1,0; 2,2)	1,3 (1,0; 2,0)	1,4 (1,1; 2,0)
GSSG	0,1 (0,0; 0,3)	0,2 (0,1; 0,3)	0,3 (0,1; 0,8)	0,4 (0,1; 1,0)	0,3 (0,2; 0,7)	0,5 (0,3; 1,0)

Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%. MDA: Malondialdeído; FOX: *xylenol orange*-férico; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada.

Na tabela 11 estão os valores das relações das quantificações de marcadores de estresse oxidativo nos tecidos.

Tabela 11. Relações das quantificações de estresse oxidativo em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)

Marcadores de estresse oxidativo	Fase secretora		Fase proliferativa	
	RM (IC 95%)	Valor-p	RM (IC 95%)	Valor-p
FOX				
Controle	1,33 (0,77; 2,29)	0,311	1,13 (0,60; 2,12)	0,706
Lesão	2,15 (1,30; 3,56)	0,005	2,99 (1,64; 5,50)	0,001
MDA				
Controle	1,29 (0,66; 2,52)	0,457	2,41 (1,12; 5,19)	0,030
Lesão	1,47 (0,79; 2,74)	0,229	1,14 (0,54; 2,40)	0,727
Carbonil				
Controle	1,28 (1,03; 1,59)	0,032	1,99 (1,54; 2,55)	<0,001
Lesão	1,66 (1,35; 2,03)	<0,001	1,64 (1,29; 2,09)	<0,001
GSH				
Controle	3,42 (1,89; 6,20)	<0,001	3,46 (1,75; 6,87)	0,001
Lesão	3,87 (2,23; 6,73)	<0,001	3,56 (1,84; 6,91)	<0,001
GSSG				
Controle	3,80 (1,32; 10,94)	0,017	4,01 (1,19; 13,52)	0,030
Lesão	4,98 (1,86; 13,32)	0,002	5,47 (1,69; 17,71)	0,007

RM: razão de médias; IC 95%: intervalo de confiança de 95%. Categorias de referência secretora: tecido eutópico, fase secretora. Categorias de referência proliferativa: tecido eutópico, fase proliferativa. MDA: malondialdeído, FOX: *xylenol orange*-férico; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada.

4.5.1 Dosagem de *ferrous oxidation* no tecido

A primeira dosagem de espécie reativa de oxigênio (ERO) realizada foi a concentração de hidroperóxidos, observada através da oxidação do ferro em *xlenol orange* (FOX). Como as ERO são moléculas muito instáveis e sua meia vida muito curta, sua avaliação direta ainda não é possível. Mas para isso alguns testes são utilizados, como estratégia de dosar a concentração de ERO indiretamente, são produtos formados pelas ERO, como o FOX, um produto primário da peroxidação lipídica. O sistema FOX detecta a formação de hidroperóxidos, que são produtos da peroxidação de lipídios insaturados.⁽¹⁴¹⁾

Nas lesões, a média de FOX foi 2,15 vezes ($p=0,005$) o valor da média no tecido eutópico na fase secretora e 2,99 vezes ($p=0,001$) o valor da média no grupo eutópico na fase proliferativa (Tabela 11).

4.5.2 Dosagem de malondialdeído no tecido

Como uma segunda estratégia de avaliar os danos lipídicos causados pelo aumento de ERO nas pacientes com endometriose, realizou-se a dosagem do malondialdeído (MDA) nos três tecidos. O MDA é uma forma indireta de quantificar dano oxidativo causado pelas ERO, considerando que o MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica e que pode ser usado como medida cumulativa desse processo. Seu teste baseia-se na reação do MDA com um cromógeno. Este aldeído reage com o agente cromógeno N-metil-2-fenilindol, produzindo um cromóforo estável, que pode ser lido em uma absorbância de 586nm.^(135,142)

A avaliação do MDA nos tecidos mostrou uma diferença significativa entre os grupos controle e eutópico na fase proliferativa, onde a média do controle foi 2,41 vezes ($p=0,030$) a média do endométrio eutópico na fase secretora (Tabela 11).

4.5.3 Avaliação de carbonil no tecido

Avaliamos o dano oxidativo proteico nos tecidos, dosando o carbonil, um dos principais marcadores de oxidação proteica, usado para medir a extensão do

dano oxidativo. O grupo carbonil (um carbono e um oxigênio ligados por uma ligação dupla na formação de aldeídos e cetonas) é formado através da oxidação da cadeia lateral de alguns aminoácidos mais suscetíveis, como a prolina, arginina, lisina e treonina ou pela clivagem oxidativa das proteínas ou também introduzidos durante a peroxidação lipídica.⁽¹⁴³⁾

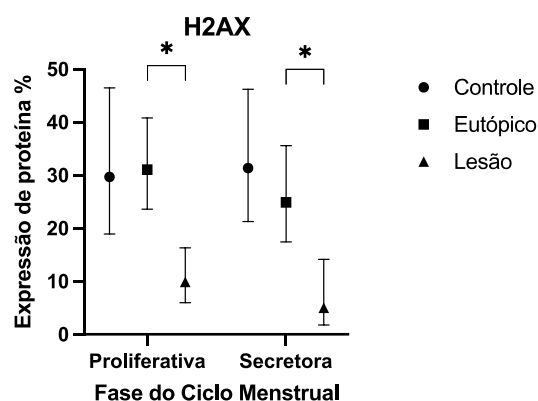
Em relação ao carbonil dosado no tecido, as lesões apresentaram uma média 66% ($p<0,001$) maior em relação à média do grupo eutópico na fase secretora. Também, observamos que o grupo controle apresentou uma média 28% ($p=0,032$) maior em relação ao eutópico na fase secretora. Na fase proliferativa a média do grupo controle foi 99% maior ($p<0,001$) e da lesão foi de 64% ($p<0,001$) maior que a média do grupo de referência (eutópico na fase proliferativa) (Tabela 11).

4.5.4 Avaliação de dano de DNA: imunoistoquímica γ -H2AX

O passo seguinte foi observar o dano oxidativo no DNA através da imunoistoquímica. Realizamos a quantificação da proteína γ -H2AX, que é resultante da quebra dupla na fita de DNA, ocorrendo a fosforilação da histona H2AX, que passa a ser chamada de γ -H2AX. A quantificação de γ -H2AX seguiu os mesmos padrões de avaliação para os marcadores de senescência celular, pelo método de histometria já descrito acima.

As figuras 10 e 11 apresentam os resultados de expressão de H2AX e o dano oxidativo no DNA enquanto na tabela 12 observamos os valores de média estimada e intervalo de confiança dos grupos.

A média do grupo lesão na fase secretora foi 0,29 vezes ($p<0,001$) menor e na fase proliferativa 0,24 vezes ($p<0,001$) menor em relação aos grupos de referência.



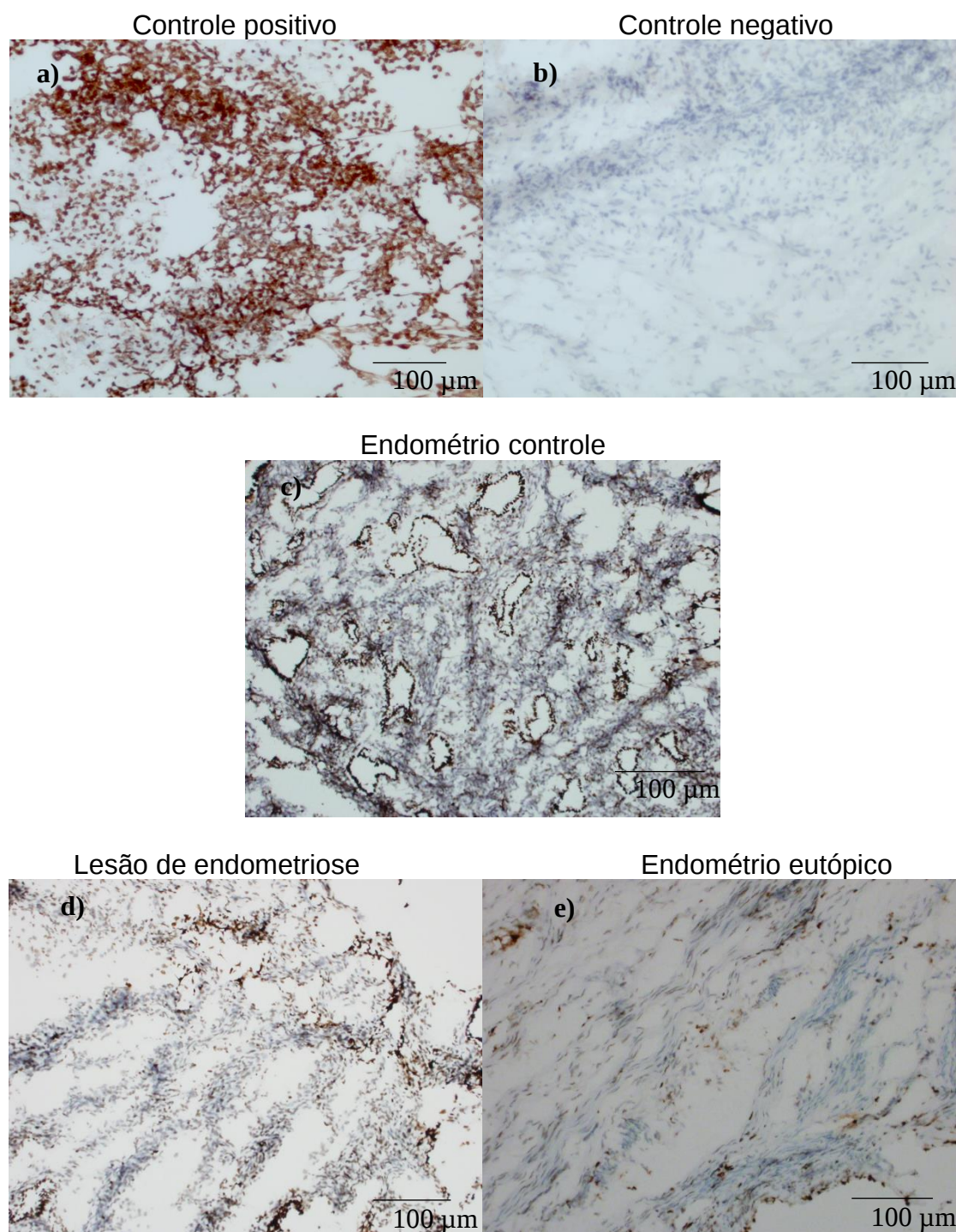
Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%. * $p < 0,05$; H2AX: proteína histona da família H2A.

Figura 10. Representação gráfica da expressão de H2AX nos diferentes tecidos (controle, eutópico e lesão) em ambas as fases do ciclo menstrual (proliferativa e secretora)

Tabela 12. Descrição das médias de expressão da proteína γ -H2AX nos tecidos (endométrio controle, endométrio eutópico e lesão)

Marcador de estresse oxidativo	Eutópico		Controle		Lesão	
	Secretora	Proliferativa	Secretora	Proliferativa	Secretora	Proliferativa
H2AX (%)	24,9 (17,4; 35,6)	31,1 (23,6; 40,8)	31,4 (21,3; 46,2)	29,7 (19,0; 46,5)	5,03 (1,8; 14,2)	9,88 (6,0; 16,0)

IIQ: intervalo interquartil. Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%; H2AX: proteína histona da família H2A.



Imagens representativas da marcação pela proteína γ -H2AX nos tecidos de endometriose e controles. A cor marrom representa a marcação pelo anticorpo γ -H2AX, a cor azul marca os núcleos celulares e os espaços em branco foram desconsiderados nas análises quantitativas. a) ovário (controle positivo da reação); b) ovário (controle negativo da reação); c) endométrio controle; d) lesão; e) endométrio eutópico. Imagens em 20x.

Figura 11. Imunoistoquímica para γ -H2AX

4.5.5 Avaliação de dano de DNA: dosagem de 8OhdG

Foi possível realizar as análises 8OhdG em 35 amostras. Destas 9 do grupo eutópico (2 na fase proliferativa e 7 na fase secretora), 13 do grupo controle (6 na fase proliferativa e 7 na fase secretora) e 13 do grupo lesão (7 na fase proliferativa e 6 na fase secretora). Desconsiderando a fase do ciclo, os valores médios estimados e IC 95% foram 3,94 (3,53; 4,38) para o grupo controle, 4,30 (3,66; 5,06) para o grupo eutópico e 4,09 (3,52; 4,76) para o grupo lesão. Não encontramos diferenças entre as comparações considerando ou não a fase do ciclo no modelo (Tabela 13).

Tabela 13. Relações das quantificações de 8OhdG em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)

Marcador de estresse oxidativo	RM (IC 95%)	Valor-p
Controlando por fase		
8OhdG		
Controle	1,000 (0,808; 1,239)	0,998
Lesão	0,963 (0,783; 1,186)	0,727
Sem controlar por fase		
8OhdG		
Controle	0,976 (0,806; 1,182)	0,802
Lesão	0,943 (0,779; 1,142)	0,553

RM: razão de médias; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; categorias de referência: tecido eutópico, fase proliferativa. 8OhdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.

4.6 Avaliação do sistema glutathiona

A resposta antioxidante foi também avaliada como uma forma de calcular o estresse oxidativo em cada tecido. O controle contra o estresse oxidativo está associado com as concentrações intracelulares de glutathiona em sua forma reduzida (GSH). A elevação do estresse oxidativo pode levar ao aumento das concentrações de GSSG no organismo. Sendo assim, o complexo GSH/GSSG é um importante dosador do sistema antioxidante na proteção celular ao estresse oxidativo que atua na neutralização de peróxidos.^(144,145) Por isso realizamos dois testes para avaliar o balanço do sistema de antioxidantes enzimáticos importantes do processo de combate às ERO composto pela GSH e GSSG (Tabelas 10 e 11; Figura 9).

Na fase secretora a lesão obteve a média de GSH 3,87 ($p<0,001$) e de GSSG 4,98 ($p=0,002$) vezes a média do grupo de referência. Já na fase proliferativa a média de GSH foi 3,56 vezes ($p<0,001$) e GSSG foi 5,47 (0,007) vezes a média do grupo de referência. O grupo controle na fase secretora teve uma média de GSH de 3,42 ($p<0,001$) e GSSG de 3,80 ($p=0,017$) vezes a média do grupo de referência. Na fase proliferativa o GSH teve uma média 3,46 ($p=0,001$) e o GSSG 4,01 ($p=0,03$) vezes a média do grupo de referência (Tabela 11).

4.7 Avaliação da razão entre a produção de espécie reativa de oxigênio e o sistema glutathiona

Em tecidos saudáveis, a glutathiona existe basicamente como GSH (aproximadamente 90%), e a razão GSSG/GSH pode ser usada como um indicativo de situações de estresse oxidativo do organismo. Por esse motivo foi realizado um cálculo da razão entre a quantidade de GSSG pela quantidade de GSH liberadas, mas não foi observada diferença significativa entre os grupos.

4.8 Resumo dos resultados de estresse oxidativo

A tabela 14 faz um resumo dos principais achados para a concentração de marcadores de estresse oxidativo entre os três diferentes tecidos na fase secretora e na fase proliferativa.

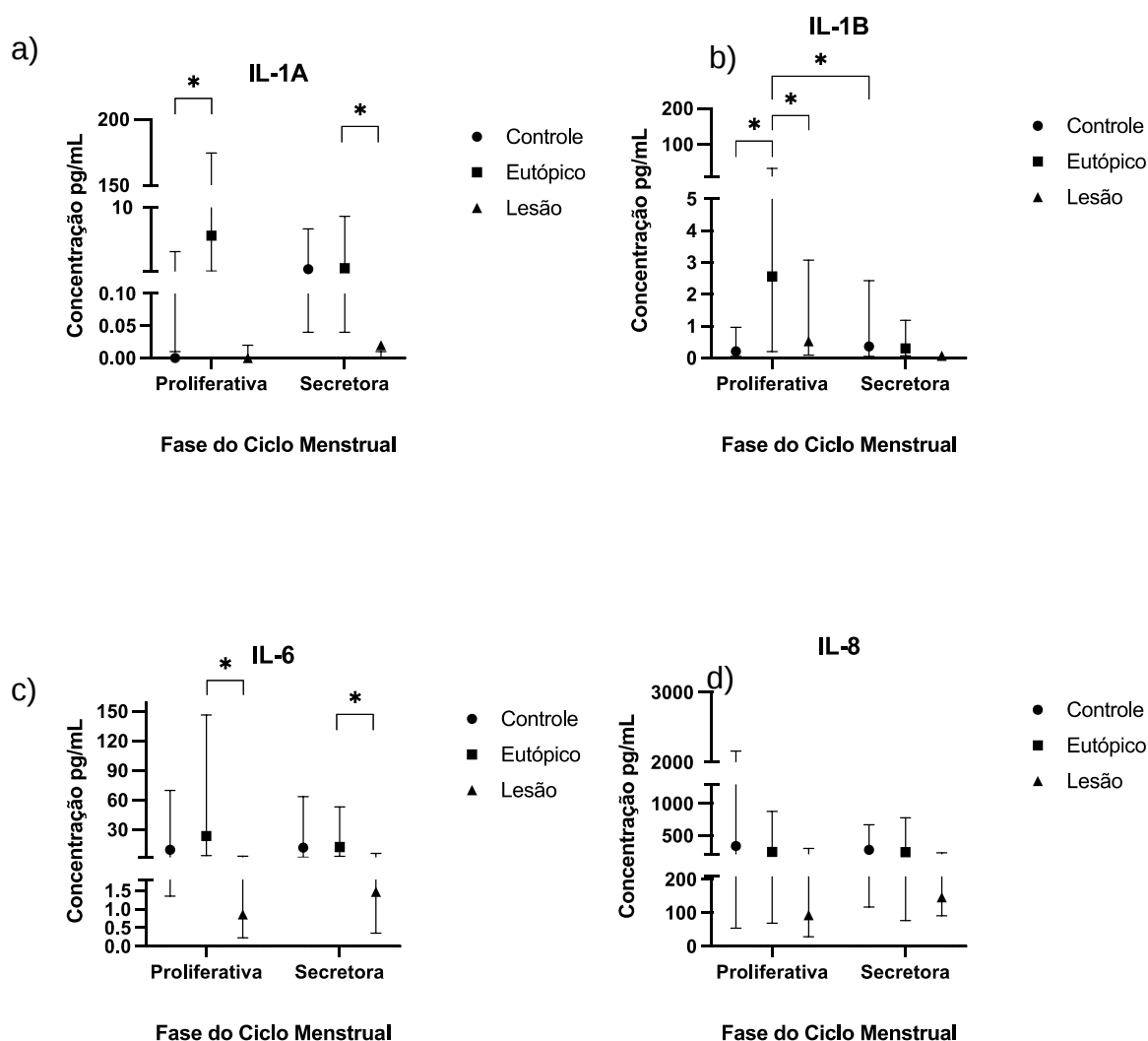
Tabela 14. Principais achados para as médias estimadas dos marcadores de estresse oxidativo carbonil, malondialdeído e FOX na comparação da lesão com endométrio eutópico e controle com endométrio eutópico todos nas fases secretora e proliferativa

Marcador	Grupo e fase			
	Controle secretora	Lesão secretora	Controle proliferativa	Lesão proliferativa
Carbonil	>	>	>	>
MDA	≅	≅	>	≅
FOX	≅	>	≅	>
GSH	>	>	>	>
GSSG	>	>	>	>

Comparação da concentração de marcadores de estresse oxidativo nos tecidos, tendo como referência o grupo eutópico na fase secretora ou o grupo eutópico na fase proliferativa. Endométrio controle secretora X endométrio eutópico secretora; lesão secretora X endométrio eutópico secretora. Os resultados com os símbolos "<" e ">" possuem $p<0,05$. MDA: malondialdeído; GSH: glutathiona oxidada; GSSG: glutathiona reduzida; FOX: oxidação férrica (*ferrous oxidation*).

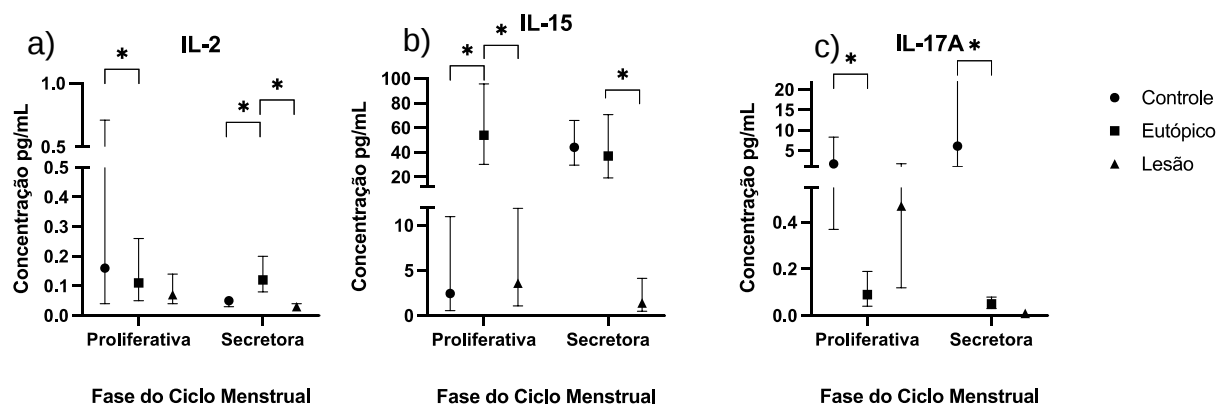
4.9 Citocinas e fenótipo secretor associado a senescência

Separamos as citocinas por grupos: clássicas (Figura 12), não clássicas-inflamatórias (Figura 13), não clássicas-anti-inflamatórias (Figura 14) e não clássicas-fatores de crescimento (Figura 15).



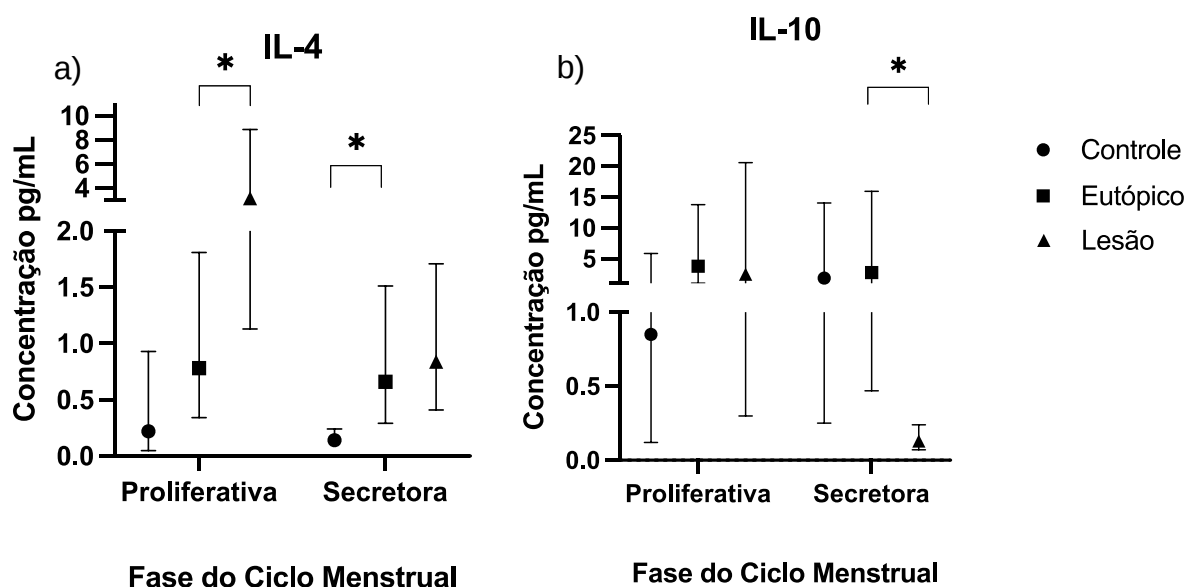
Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%. Citocinas a) IL-1 α ; b) IL-1 β ; c) IL-6; d) IL-8. * $p < 0,05$. IL: Interleucina.

Figura 12. Concentrações das citocinas SASP clássicas (IL-1; IL-6 e IL-8) em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) e fase do ciclo menstrual (fase secretora e proliferativa) obtidas no tecido de pacientes com e sem endometriose



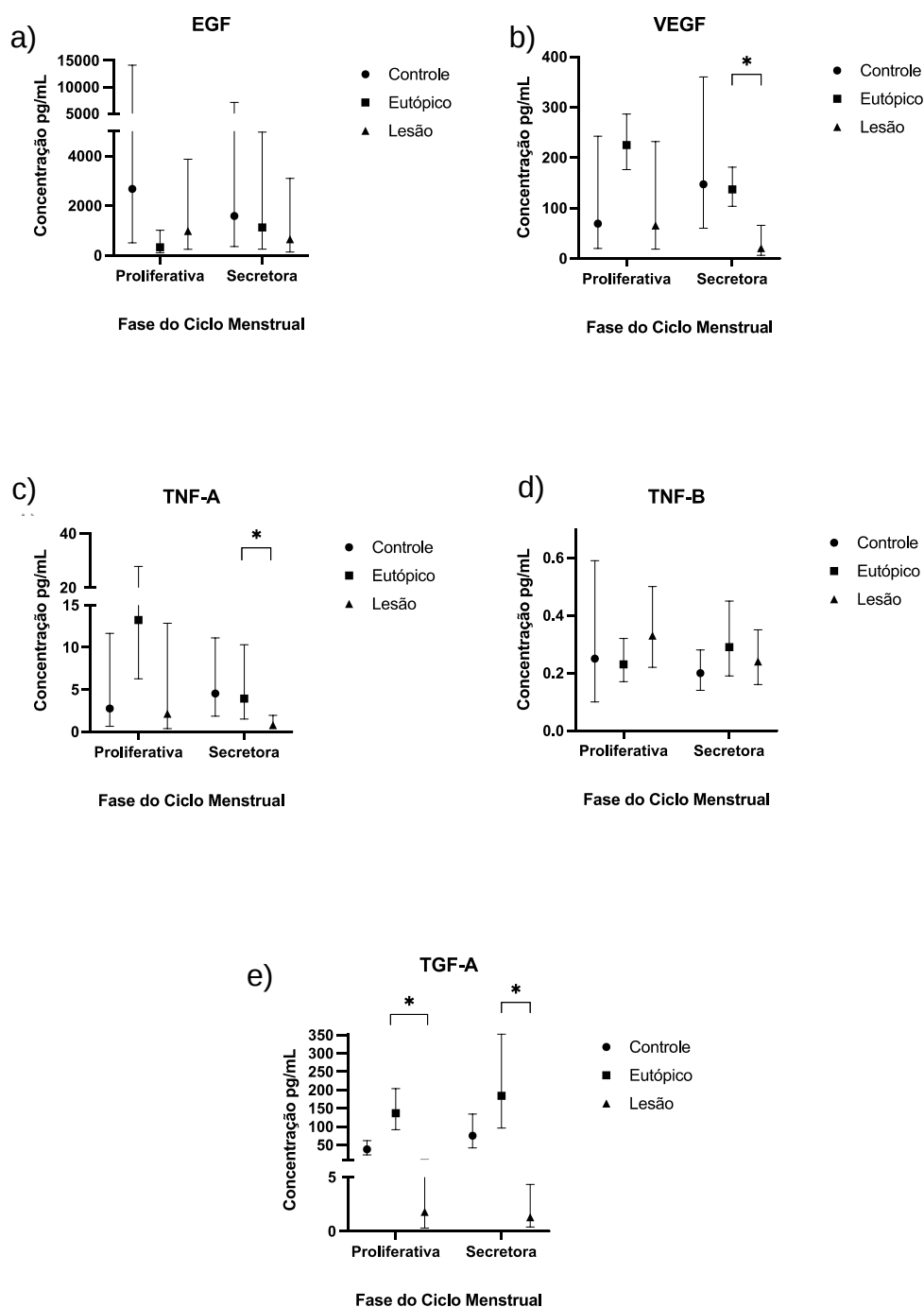
Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%. Citocinas a) IL-2; b) IL-15; c) IL-17A. * $p < 0,05$. IL: Interleucina.

Figura 13. Concentrações das citocinas pró-inflamatórias SASP não clássicas (IL-2; IL-15 e IL-17) em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) e fase do ciclo menstrual (fase secretora e proliferativa) tomadas no tecido de pacientes com e sem endometriose



Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%. Citocinas a) IL-4; b) IL-10 * $p < 0,05$. IL: Interleucina.

Figura 14. Concentrações das citocinas anti-inflamatórias SASP não clássicas (IL-4, IL-10) em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) e fase do ciclo menstrual (fase secretora e proliferativa) tomadas no tecido de pacientes com e sem endometriose



Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%. Fatores de crescimento a) endotelial, e b) vascular endotelial; fatores de necrose tumoral c) alfa, e d) beta; e) fator de crescimento transformação alfa. * $p < 0,05$. VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; TNF: fator de necrose tumoral; TGF-A: fator de crescimento transformador alfa.

Figura 15. Concentrações dos fatores de crescimento e tumoral (EGF, VEGF, TGF-A e TNF) em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) e fase do ciclo menstrual (fase secretora e proliferativa) tomadas no tecido de pacientes com e sem endometriose

Foram realizadas comparações entre os grupos e as fases do ciclo menstrual de cada uma das citocinas avaliadas, em relação ao grupo de referência

endométrio eutópico na fase secretora e endométrio eutópico na fase proliferativa (Tabela 15).

Tabela 15. Relações das quantificações das citocinas em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)

Citocinas (pg/mL)	Fase secretora		Fase proliferativa	
	RM (IC 95%)	Valor-p	RM (IC 95%)	Valor-p
EGF				
Controle	1,22 (0,18; 8,25)	0,836	10,70 (1,23; 93,15)	0,037
Lesão	0,63 (0,11; 3,69)	0,610	3,32 (0,38; 28,91)	0,282
TGF-A				
Controle	0,37 (0,11; 1,31)	0,130	0,28 (0,07; 1,16)	0,086
Lesão	0,01 (0,00; 0,03)	<0,001	0,03 (0,01; 0,14)	<0,001
IL-10				
Controle	0,66 (0,08; 5,21)	0,692	0,31 (0,03; 3,29)	0,338
Lesão	0,03 (0,00; 0,18)	0,001	1,07 (0,10; 11,30)	0,954
IL-15				
Controle	1,08 (0,32; 3,58)	0,904	0,08 (0,02; 0,30)	0,001
Lesão	0,05 (0,02; 0,16)	<0,001	0,09 (0,02; 0,35)	0,001
IL-17A				
Controle	127,4 (28,78; 564,0)	<0,001	20,00 (3,70; 108,1)	0,001
Lesão	0,26 (0,07; 1,03)	0,062	5,34 (0,99; 28,87)	0,057
IL-1 α				
Controle	0,55 (0,02; 12,97)	0,713	0,02 (0,00; 0,74)	0,039
Lesão	0,01 (0,00; 0,20)	0,004	0,03 (0,00; 1,20)	0,069
IL-1 β				
Controle	1,64 (0,22; 12,20)	0,629	0,03 (0,00; 0,29)	0,004
Lesão	0,21 (0,03; 1,36)	0,107	0,08 (0,01; 0,83)	0,039
IL-2				
Controle	0,36 (0,16; 0,81)	0,016	3,06 (1,22; 7,71)	0,021
Lesão	0,27 (0,13; 0,57)	0,001	0,57 (0,23; 1,42)	0,230
IL-4				
Controle	0,18 (0,06; 0,57)	0,006	0,48 (0,13; 1,81)	0,284
Lesão	1,17 (0,40; 3,42)	0,779	4,55 (1,22; 16,96)	0,028
IL-6				
Controle	0,95 (0,13; 7,28)	0,959	0,46 (0,05; 4,62)	0,511
Lesão	0,11 (0,02; 0,75)	0,028	0,03 (0,00; 0,28)	0,004
IL-8				
Controle	0,85 (0,21; 3,55)	0,827	2,24 (0,44; 11,27)	0,334
Lesão	0,42 (0,11; 1,59)	0,208	0,36 (0,07; 1,83)	0,226
TNF-A				
Controle	1,04 (0,25; 4,41)	0,954	0,29 (0,06; 1,51)	0,149
Lesão	0,19 (0,05; 0,72)	0,019	0,36 (0,07; 1,88)	0,230
TNF-B				
Controle	0,63 (0,34; 1,15)	0,135	1,70 (0,85; 3,41)	0,139
Lesão	0,79 (0,45; 1,37)	0,404	1,49 (0,76; 2,95)	0,254
VEGF				
Controle	1,18 (0,37; 3,82)	0,782	0,42 (0,11; 1,59)	0,207
Lesão	0,24 (0,08; 0,72)	0,014	0,40 (0,11; 1,51)	0,181
IL-4/IL-2				
Controle	0,33 (0,13; 0,83)	0,022	0,22 (0,08; 0,61)	0,005
Lesão	2,43 (1,05; 5,64)	0,044	4,86 (1,75; 13,56)	0,004

RM: razão de médias; IC 95%: intervalo de confiança de 95%. Categorias de referência secretora: tecido eutópico, fase secretora e tecido eutópico x fase secretora. Categorias de referência proliferativa: tecido eutópico, fase proliferativa e tecido eutópico x fase proliferativa. IL: Interleucina; TGF-A: fator de crescimento transformador alfa; TNF: fator de necrose tumoral; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; EGF: fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor*).

Avaliando somente a fase secretora, observamos que a lesão apresentou média menor de IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-10, IL-15, TGF-A, VEGF e TNF-A quando comparada com o grupo eutópico. Ao mesmo tempo o grupo eutópico exibiu menor média de IL-17A e maior de IL-2, IL-4 e IL4/IL2 em relação ao grupo controle.

Considerando a fase proliferativa, apenas a concentração média da IL-4 e de IL4/IL2 foi detectada maior na lesão que no endométrio eutópico. Já IL-1 β , IL-15, IL-6 e TGFA apresentaram diminuição da média nas lesões em comparação ao grupo eutópico. Em paralelo o endométrio eutópico exibiu maior média de IL-1 α , IL-1 β , IL4/IL2 e IL-15 e menor de EGF, IL-2 e IL-17A quando comparado ao grupo controle.

Não houve associação estatisticamente significativa entre fase de ciclo ou grupo de pertencimento e as variáveis IL-8 e TNF-B nas duas fases.

4.10 Resumo das citocinas e fenótipo secretor associado a senescência

As tabelas 16 e 17 fazem um resumo dos principais achados para as concentrações de citocinas. Na tabela 16, observa-se os resultados entre os três diferentes tecidos na fase secretora. Na tabela 17, os grupos estão na fase proliferativa.

Tabela 16. Resumo dos principais achados para as médias estimadas das concentrações de citocinas nos tecidos (controle, eutópico e lesão) na fase secretora

Grupo e fase			Grupo e fase		
Marcador	Controle-secretora	Lesão-secretora	Marcador	Controle-secretora	Lesão-secretora
EGF	$\cong$	$\cong$	IL-1 α	$\cong$	<
TGF-A	$\cong$	<	IL-4	<	$\cong$
IL-10	$\cong$	<	IL-6	$\cong$	<
IL-15	$\cong$	<	IL-8	$\cong$	$\cong$
IL-17A	>	$\cong$	TNF-A	$\cong$	<
IL-1 β	$\cong$	$\cong$	TNF-B	$\cong$	$\cong$
IL-2	<	<	VEGF	$\cong$	<

Referência grupo eutópico e fase secretora. Endométrio controle secretora X endométrio eutópico secretora; lesão secretora X endométrio eutópico secretora. "<" e ">" possuem p <0,05. IL: Interleucina; TGF-A: fator de crescimento transformador alfa; TNF-A: fator de necrose tumoral alfa; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; EGF: fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor*).

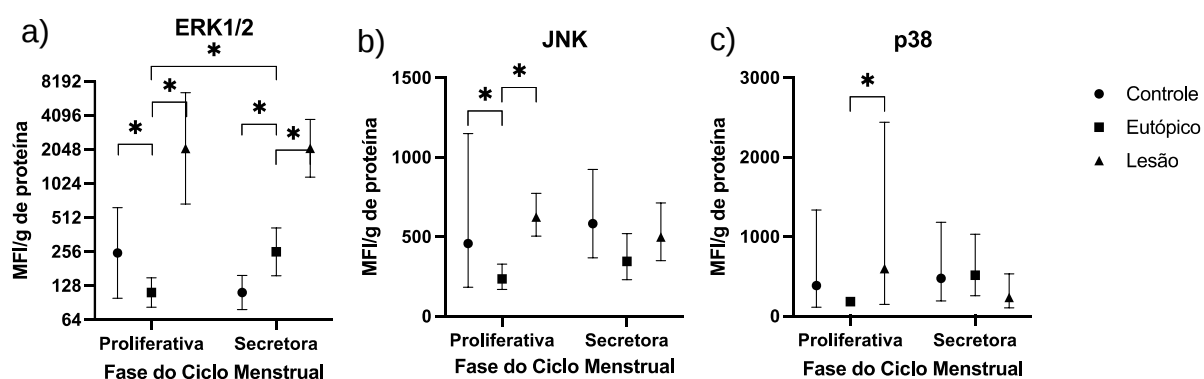
Tabela 17. Resumo dos principais achados para as médias estimadas das concentrações de citocinas nos tecidos (controle, eutópico e lesão) na fase proliferativa

Grupo e fase			Grupo e fase		
Marcador	Controle-proliferativa	Lesão-proliferativa	Marcador	Controle-proliferativa	Lesão-proliferativa
EGF	>	≅	IL-1α	<	≅
TGF-A	≅	<	IL-4	≅	>
IL-10	≅	≅	IL-6	≅	≅
IL-15	<	<	IL-8	≅	≅
IL-17A	>	≅	TNF-A	≅	≅
IL-1β	<	<	TNF-B	≅	≅
IL-2	>	≅	VEGF	≅	≅

Referência grupo eutópico e fase proliferativa. Endométrio controle proliferativa X endométrio eutópico proliferativa; lesão proliferativa X endométrio eutópico proliferativa. “<” e “>” possuem $p < 0,05$. IL: Interleucina; TGF-A: fator de crescimento transformador alfa; EGF: fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor*).

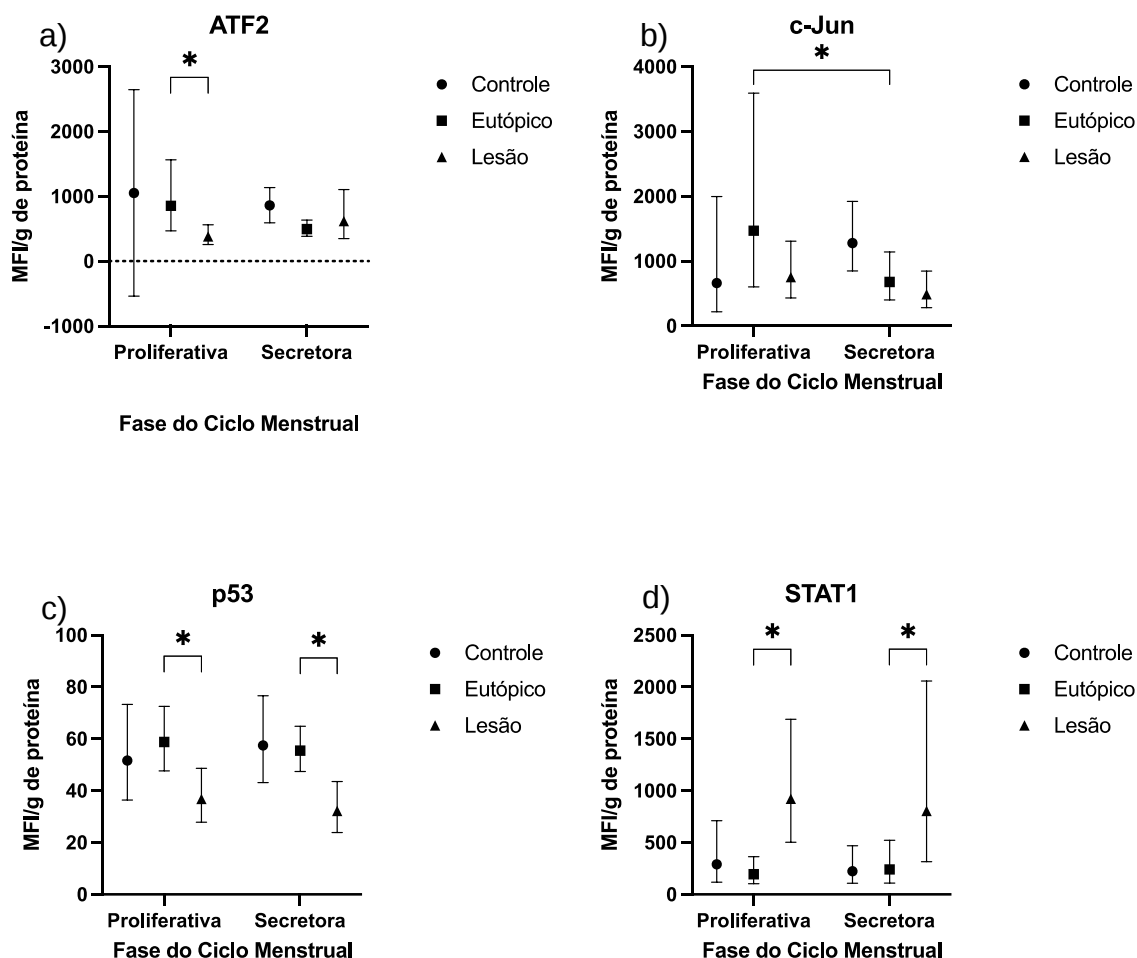
4.11 Proteínas da via MAPK na endometriose

Consideramos para as análises da via MAPK as principais proteínas envolvidas, sendo elas separadas por MAPK: ERK, JNK e P38; MAP2K: MEK1; fatores de transcrição: ATF2, c-Jun, p53 e STAT1; *heatshok protein*: HSP27 e a quinase MSK1. As figuras 16 a 18 apresentam graficamente os resultados obtidos e as diferenças observadas entre os grupos.



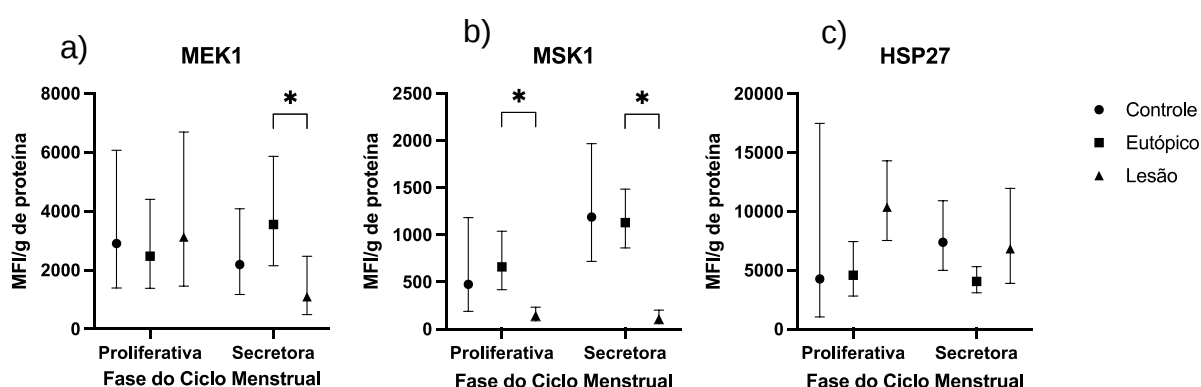
Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%. a) ERK1/2; b) JNK; c) P38. * $p < 0,05$. ERK: *extracellular signal-regulated kinases*; JNK: *c-Jun NH2-terminal kinase*.

Figura 16. Concentrações das proteínas da via MAPK em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)



Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%. a) ATF2; b) c-Jun; c) p53; d) STAT1. * $p < 0,05$. STAT1: ativador de transcrição 1; ATF-2: fator de transcrição ativador 2.

Figura 17. Concentrações das proteínas da via MAPK em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)



Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%. a) MEK1; b) MSK1; c) HSP27. * $p < 0,05$. MEK: quinase ativadora da MAP quinase; HSP27: proteína de choque térmico 27.

Figura 18. Concentrações das proteínas da via MAPK em amostras de tecidos (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)

Os valores médios estimados e intervalos de 95% de confiança podem ser vistos na tabela 18 e as relações estão descritas na tabela 19.

Tabela 18. Valores médios estimados proteínas da via MAPK em amostras de tecidos (endométrio controle, endométrio eutópico e lesão) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)

Proteínas (MFI/g de proteína)	Eutópico		Controle		Lesão	
	Secretora (x10 ²)	Proliferativa (x10 ²)	Secretora (x10 ²)	Proliferativa (x10 ²)	Secretora (x10 ²)	Proliferativa (x10 ²)
ATF-2	4,9 (3,8; 6,4)	8,6 (4,7; 15,6)	8,6 (6,3; 11,8)	10,5 (3,2; 35,0)	6,2 (3,5; 11,1)	3,8 (2,6; 5,6)
C-JUNK	6,8 (4,0; 11,4)	14,7 (6,0; 35,9)	12,8 (8,9; 19,2)	6,6 (2,2; 20,0)	4,9 (2,8; 8,5)	7,5 (4,3; 13,1)
ERK	2,5 (1,6; 4,1)	1,1 (0,8; 1,5)	1,1 (0,8; 1,6)	2,5 (1,0; 6,2)	21,0 (11,7; 37,7)	20,9 (6,7; 65,0)
HSP27	40,6 (31,0; 53,1)	45,7 (28,1; 74,4)	73,8 (50,0; 109)	42,7 (10,4; 175)	68,3 (39,0; 120)	103,7 (75,2; 143)
JNK	3,5 (2,3; 5,2)	2,3 (1,7; 3,3)	5,8 (3,7; 9,2)	4,6 (1,8; 11,5)	5,0 (3,5; 7,1)	6,2 (5,0; 7,7)
MEK1	36,0 (21,5; 58,6)	24,7 (13,8; 44,0)	21,9 (11,7; 40,8)	29,0 (13,9; 60,7)	11,0 (5,0; 24,7)	31,2 (14,5; 67,0)
MSK1	11,3 (8,6; 14,8)	6,6 (4,2; 10,4)	11,9 (7,2; 19,7)	4,7 (1,9; 11,8)	1,1 (0,6; 2,0)	1,4 (0,9; 2,3)
p38	5,1 (2,6; 10,3)	1,8 (1,5; 2,2)	4,7 (1,9; 11,8)	3,9 (1,1; 13,3)	2,3 (1,0; 5,3)	6,0 (1,5; 24,4)
p53	0,6 (0,5; 0,7)	0,6 (0,5; 0,7)	0,6 (0,4; 0,8)	0,5 (0,4; 0,7)	0,3 (0,2; 0,4)	0,4 (0,3; 0,5)
STAT1	2,4 (1,1; 5,2)	2,0 (1,0; 3,6)	2,2 (1,1; 4,7)	3,0 (1,2; 7,1)	8,1 (3,2; 20,6)	9,2 (5,0; 16,9)

Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%. ATF-2: fator de transcrição ativador 2; JNK: *c-Jun NH2-terminal kinase*; MEK: quinase ativadora da MAP quinase; STAT1: fator transdutor de sinal e ativador de transcrição 1; MSK1: quinase ativada por mitogeno e estresse 1 (*Mitogen- and Stress-Activated Kinase 1*); C-JUNK: quinase N terminal; HSP27: proteína de choque térmico 27.

Tabela 19. Relações das proteínas da via MAPK em tecidos (lesão, eutópico e controle) de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)

Proteínas (MFI/g de proteína)	Fase secretora		Fase proliferativa	
	RM (IC 95%)	Valor-p	RM (IC 95%)	Valor-p
ATF-2				
Controle	1,74 (0,87; 3,47)	0,123	1,97 (0,89; 4,38)	0,103
Lesão	1,52 (0,80; 2,89)	0,212	0,41 (0,19; 0,88)	0,027
c-Jun				
Controle	1,76 (0,77; 4,00)	0,185	0,51 (0,20; 1,31)	0,167
Lesão	0,75 (0,35; 1,60)	0,457	0,40 (0,16; 1,01)	0,058
ERK				
Controle	0,42 (0,19; 0,93)	0,038	2,98 (1,18; 7,58)	0,026
Lesão	9,01 (4,29; 18,94)	<0,001	29,57 (12,07; 72,43)	<0,001
HSP27				
Controle	1,87 (0,90; 3,87)	0,100	2,02 (0,86; 4,74)	0,112
Lesão	1,95 (0,99; 3,84)	0,060	2,15 (0,96; 4,84)	0,070
JNK				
Controle	1,70 (0,97; 2,98)	0,070	2,94 (1,53; 5,65)	0,002
Lesão	1,41 (0,84; 2,38)	0,202	2,62 (1,40; 4,89)	0,004
MEK1				
Controle	0,63 (0,26; 1,53)	0,313	1,24 (0,45; 3,43)	0,677
Lesão	0,39 (0,17; 0,89)	0,030	1,39 (0,52; 3,70)	0,516
MSK1				
Controle	1,12 (0,55; 2,29)	0,759	0,95 (0,42; 2,18)	0,904

continua...

...continuação				
Lesão	0,12 (0,06; 0,24)	<0,001	0,22 (0,10; 0,49)	<0,001
p38				
Controle	1,01 (0,32; 3,19)	0,984	2,77 (0,73; 10,51)	0,140
Lesão	0,52 (0,18; 1,50)	0,231	5,17 (1,43; 18,76)	0,016
p53				
Controle	1,10 (0,78; 1,54)	0,601	0,94 (0,63; 1,39)	0,747
Lesão	0,65 (0,47; 0,90)	0,011	0,65 (0,44; 0,95)	0,030
STAT1				
Controle	0,86 (0,30; 2,49)	0,784	1,64 (0,49; 5,50)	0,427
Lesão	4,23 (1,59; 11,24)	0,006	4,77 (1,48; 15,34)	0,012

RM: razão de médias; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; Categorias de referência para secretora: tecido eutópico e fase secretora; Categorias de referência para proliferativa: tecido eutópico e fase proliferativa. ERK: *extracellular signal-regulated kinases*; JNK: *c-Jun NH2-terminal kinase*; STAT1: transdutor de sinal; ativador de transcrição 1; ATF-2: fator de transcrição ativador 2; MEK: quinase ativadora da MAP quinase; MSK1: quinase ativada por mitogeno e estresse 1 (*Mitogen- and Stress-Activated Kinase 1*); C-JUNK: quinase N terminal; HSP27: proteína de choque térmico 27.

Para a lesão na fase secretora, observamos uma média maior de ERK e STAT1 e diminuição da média de p53, MEK1 e MSK1 em relação ao endométrio eutópico. Já a lesão na fase proliferativa observamos uma média maior de ERK, JNK, P38 e STAT1, assim como média menor de ATF2, p53 e MSK1. Considerando a comparação entre o grupo eutópico e o controle, notamos no endométrio eutópico durante fase secretora uma média maior de ERK e na fase proliferativa há uma média menor de ERK e JNK (Tabela 19; Figuras 16 a 18).

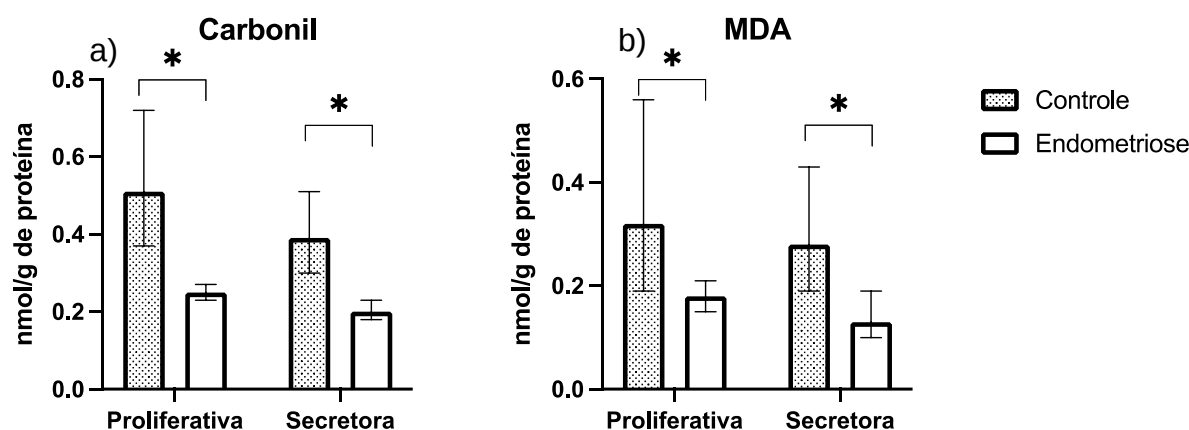
4.12 Avaliações no fluido peritoneal

Nas análises de estresse oxidativo e citocinas, cada variável possui apenas uma medida por indivíduo. No caso dessas comparações o grupo controle em ambas as fases foi utilizado como referência.

4.13 Avaliações de marcadores de estresse oxidativo

Realizamos as verificações de FOX, MDA e carbonil no fluido peritoneal das pacientes. As análises comparativas dos modelos podem ser vistas na figura 19. Os valores médios estão descritos na tabela 20 e as razões entre as médias na tabela 21. Dosamos também a concentração de FOX no fluido peritoneal das pacientes, entretanto, não foi possível identificar uma concentração mínima desse

produto no fluido. Portanto, esses resultados não serão adicionados no projeto, pois não sabemos se o resultado foi negativo porque não há a formação de FOX no fluido peritoneal ou se o teste não tem sensibilidade para dosar esse produto nas concentrações encontradas especificamente no fluido peritoneal.



Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%. a) carbonil; b) MDA. * $p < 0,05$. MDA: malondialdeído.

Figura 19. Concentrações de carbonil e MDA em amostras de fluido peritoneal de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)

Tabela 20. Valores médios das concentrações de carbonil e MDA em amostras de fluido peritoneal de pacientes com e sem endometriose (fase secretora e proliferativa)

Marcadores de estresse oxidativo	Controle		Endometriose	
	Secretora	Proliferativa	Secretora	Proliferativa
Carbonil (nmol/g de fluido)	14,7 (10,3; 21,2)	11,3 (7,1; 18,2)	8,2 (7,0; 9,6)	8,6 (7,7; 9,6)
MDA (nmol/g de fluido)	10,5 (6,3; 17,5)	7,9 (3,7; 17,1)	4,6 (2,8; 7,4)	6,2 (5,0; 7,6)

Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%. MDA: malondialdeído.

Tabela 21. Resultados das quantificações de estresse oxidativo obtidas em fluido peritoneal de paciente com e sem endometriose (fase proliferativa e secretora)

Marcadores de estresse oxidativo	Fase secretora		Fase proliferativa	
	RM (IC 95%)	Valor-p	RM (IC 95%)	Valor-p
Carbonil (nmol/g de fluido peritoneal)				
Endometriose	0,48 (0,37; 0,62)	<0,001	0,43 (0,33; 0,56)	<0,001
MDA (nmol/g de fluido peritoneal)				
Endometriose	0,46 (0,29; 0,73)	0,002	0,46 (0,29; 0,74)	0,003

RM: razão de médias; MDA : malondialdeído. IC 95%: intervalo de confiança de 95%; Categorias de referência: grupo controle, fase secretora e grupo controle, fase proliferativa.

4.13.1 Dosagem de malondialdeído no fluido peritoneal

Realizamos o mesmo teste de cálculo de concentração de MDA no fluido peritoneal das pacientes e observamos um aumento significativo na concentração de MDA no grupo controle. A média de MDA do grupo endometriose em relação à média do grupo controle, é menor em ambas as fases do ciclo.

4.13.2 Avaliação de carbonil no fluido peritoneal

Em relação ao carbonil a média do grupo endometriose é 52% menor ($p < 0,001$) que do grupo controle na fase secretora e 57% menor que a média do grupo controle na fase proliferativa.

4.13.3 Avaliação das concentrações de citocinas no fluido peritoneal

Observamos que de um modo geral, há uma diminuição significativa nas médias das concentrações das citocinas (TGF- α , IL-15, IL-1 β , IL-2 e TNF- α) no grupo endometriose, em relação ao grupo controle na fase secretora. Por outro lado, a fase proliferativa apresenta a média do grupo endometriose maior em relação à média do grupo controle para as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17A e menor para as citocinas IL-4 e TNF- β . Tabela 22 mostra as médias das concentrações e a Tabela 23 apresenta os resultados para as citocinas dosadas no fluido peritoneal das pacientes incluídas no estudo.

Tabela 22. Valores médios estimados das citocinas em fluido peritoneal de pacientes com e sem endometriose (fase proliferativa e secretora)

Citocinas (pg/mL)	Controle		Endometriose	
	Secretora	Proliferativa	Secretora	Proliferativa
EGF	9,02 (2,68; 30,38)	4,26 (1,46; 12,42)	1,71 (0,50; 5,87)	2,87 (1,17; 7,04)
TGF- α	4,12 (1,18; 14,38)	4,26 (1,46; 12,42)	1,71 (0,50; 5,87)	2,87 (1,17; 7,04)
IL-10	70,18 (43,12; 114,22)	52,37 (20,67; 132,68)	52,72 (38,45; 72,29)	246,34 (119,11; 509,48)
IL-15	38,80 (26,11; 57,66)	20,77 (12,48; 34,57)	22,49 (18,01; 28,08)	27,21 (20,25; 36,56)

continua...

...continuação

IL-17A	4,27 (2,41; 7,57)	1,83 (1,53; 2,18)	2,14 (1,65; 2,79)	3,50 (1,68; 7,29)
IL-1 α	3,44 (0,16; 74,16)	1,23 (0,18; 8,22)	0,15 (0,01; 1,70)	0,10 (0,02; 0,70)
IL-1 β	1,66 (0,92; 2,99)	0,94 (0,75; 1,16)	0,69 (0,64; 0,75)	1,35 (0,79; 2,31)
IL-2	1,88 (1,23; 2,89)	1,13 (1,03; 1,23)	0,95 (0,87; 1,04)	1,33 (0,89; 1,97)
IL-4	0,64 (0,08; 5,46)	0,47 (0,03; 7,76)	0,12 (0,02; 0,80)	0,08 (0,04; 0,16)
IL-6	58,13 (15,74; 214,63)	16,06 (8,08; 31,92)	34,80 (18,82; 64,33)	254,43 (52,65; 1229,66)
IL-8	47,45 (8,50; 265,03)	55,56 (9,41; 328,10)	26,12 (13,78; 49,53)	78,66 (34,97; 176,94)
TNF-A	33,09 (19,15; 57,17)	21,19 (12,29; 36,54)	16,88 (12,93; 22,03)	26,81 (18,22; 39,45)
TNF-B	0,15 (0,01; 2,43)	0,16 (0,01; 4,00)	0,06 (0,01; 0,56)	0,02 (0,01; 0,04)
VEGF	32,42 (3,87; 271,55)	15,28 (1,90; 122,95)	15,13 (0,78; 292,74)	31,85 (7,39; 137,17)

Dados expressos por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%. TNF: fator de necrose tumoral; TGF-A: fator de crescimento transformador alfa; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; IL: Interleucina; EGF: fator de crescimento epidermal.

Tabela 23. Resultados das quantificações de citocinas obtidas em fluido peritoneal de paciente com e sem endometriose (fase proliferativa e secretora)

Citocinas (pg/mL)	Fase secretora		Fase proliferativa	
	RM (IC 95%)	Valor-p	RM (IC 95%)	Valor-p
EGF				
Endometriose	0,228 (0,049; 1,055)	0,067	0,715 (0,153; 3,335)	0,673
TGF-A				
Endometriose	0,100 (0,039; 0,258)	<0,001	1,480 (0,598; 3,661)	0,402
IL-10				
Endometriose	0,730 (0,305; 1,745)	0,483	5,088 (2,107; 12,284)	0,001
IL-15				
Endometriose	0,548 (0,346; 0,869)	0,015	1,241 (0,781; 1,972)	0,367
IL-17A				
Endometriose	0,467 (0,210; 1,040)	0,071	2,953 (1,273; 6,849)	0,016
IL-1 α				
Endometriose	0,038 (0,002; 0,905)	0,051	0,111 (0,004; 2,741)	0,188
IL-1 β				
Endometriose	0,362 (0,198; 0,665)	0,002	1,923 (1,033; 3,579)	0,047
IL-2				
Endometriose	0,457 (0,289; 0,722)	0,002	1,446 (0,900; 2,322)	0,137
IL-4				
Endometriose	0,205 (0,018; 2,285)	0,206	0,062 (0,005; 0,735)	0,034
IL-6				
Endometriose	0,492 (0,091; 2,644)	0,414	35,79(6,38; 200,694)	<0,001
IL-8				
Endometriose	0,285 (0,057; 1,416)	0,134	0,884 (0,179; 4,362)	0,881

continua...

...continuação

TNF-A				
Endometriose	0,444 (0,250; 0,786)	0,009	1,252 (0,705; 2,223)	0,449
TNF-B				
Endometriose	0,348 (0,019; 6,404)	0,482	0,041 (0,002; 0,816)	0,044
VEGF				
Endometriose	1,224 (0,054; 27,973)	0,900	1,984 (0,087; 45,412)	0,671

RM: razão de médias; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; categorias de referência: grupo controle, fase secretora e grupo controle, fase proliferativa. IL: Interleucina; TGF-A: fator de crescimento transformador alfa; TNF: fator de necrose tumoral; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular.

4.13.4 Avaliação da concentração de 8-OHdG no fluido peritoneal

Na fase secretora, o tecido eutópico de mulheres com endometriose apresenta uma diminuição na média de 8-OHdG em 49,3% ($p < 0,001$), em relação ao grupo controle (Tabela 24).

Tabela 24. Modelo misto para a variável de dano de DNA como desfecho no fluido peritoneal de pacientes com e sem endometriose, tendo como referência o grupo controle na fase secretora

Marcador de estresse oxidativo (ng/mL de fluido peritoneal)	RM (IC 95%)	Valor-p
Fase secretora		
8-OHdG – n (%) (N=41)		
Endometriose	0,507 (0,374; 0,687)	<0,001
Fase proliferativa		
8-OHdG – n (%) (N=41)		
Endometriose	0,997 (0,732; 1,357)	0,985

RM: razão de médias; IC: intervalo de confiança; categoria de referência do grupo: controle; categoria de referência da fase: secretora e fase proliferativa. 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.

4.14 Avaliação da relação entre duas variáveis dosadas nos tecidos: relação entre concentração de proteínas como variável desfecho e citocinas como variável explicativa

Consideramos as médias ajustadas das concentrações de proteínas como variáveis explicativas e as médias ajustadas das concentrações de citocinas como variáveis desfecho controlando por grupo, fase de ciclo e interação entre grupo e fase. Nota-se que o aumento de uma unidade de p16^{Ink4a} está associado a um aumento em IL-17A, e um aumento de uma unidade em Lamin b1 está associado à uma diminuição de IL-1 α e IL-2 (Figura 20).

p16	IL-1A	=	Lamin B1	IL-1A	<
	IL-1B	=		IL-1B	=
	IL-2	=		IL-2	<
	IL-4	=		IL-4	=
	IL-6	=		IL-6	=
	IL-8	=		IL-8	=
	IL-10	=		IL-10	=
	IL-15	=		IL-15	=
	IL-17A	>		IL-17A	=
	TGF-A	=		TGF-A	=
	EGF	=		EGF	=
	VEGF	=		VEGF	=
	TNF-A	=		TNF-A	=
	TNFB	=		TNFB	=

IL-1B	IL-1A	=	H2AX	IL-1A	=
	IL-1B	=		IL-1B	=
	IL-2	=		IL-2	=
	IL-4	=		IL-4	=
	IL-6	=		IL-6	=
	IL-8	=		IL-8	=
	IL-10	=		IL-10	=
	IL-15	=		IL-15	=
	IL-17A	=		IL-17A	=
	TGF-A	=		TGF-A	=
	EGF	=		EGF	=
	VEGF	=		VEGF	=
	TNF-A	=		TNF-A	=
	TNFB	=		TNFB	=

Representação do que ocorre quando há um aumento na concentração de uma unidade na expressão de p16^{Ink4a}, Lamin b1, IL-1 β e H2AX. > indica aumento estatisticamente diferente nas concentrações. < indica diminuição estatisticamente diferente das concentrações. = valor sem significância estatística. IL: Interleucina; TGF-A: fator de crescimento transformador alfa; TNF: fator de necrose tumoral; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; H2AX: proteína histona da família H2A; EGF: fator de crescimento epidermal.

Figura 20. Representação das relações entre p16^{Ink4a}, IL-1 β , Lamin b1 e H2AX e as citocinas, controlando por tipo de tecido (controle, eutópico e lesão) e fase do ciclo (proliferativa e secretora)

4.15 Avaliação da relação entre concentração dos marcadores de estresse oxidativo como variáveis explicativas e medidas das concentrações das proteínas como variáveis desfecho

Consideramos as médias ajustadas das concentrações dos marcadores de estresse oxidativo como variáveis explicativas e as médias ajustadas das concentrações de proteínas como variáveis desfecho controlando por grupo, fase de ciclo e interação entre grupo e fase. Observa-se os resultados na figura 21. Observamos que carbonil e H2AX estão inversamente associados e MDA e IL-1B estão positivamente associados.

CARBONIL	p16	=	FOX	p16	=	MDA	p16	=
	Lamin B1	=		Lamin B1	=		Lamin B1	=
	IL-1B	=		IL-1B	=		IL-1B	>
	H2AX	<		H2AX	=		H2AX	=

GSH	p16	=	GSSG	p16	=
	Lamin B1	=		Lamin B1	=
	IL-1B	=		IL-1B	=
	H2AX	=		H2AX	=

Representação do que ocorre quando há um aumento na concentração de carbonil, FOX, MDA, GSH e GSSG controlando por grupo e fase do ciclo. > indica aumento estatisticamente diferente nas concentrações. < indica diminuição estatisticamente diferente das concentrações. = valor sem significância estatística. IL: Interleucina; FOX: oxidação férrica (*ferrous oxidation*); TGF- α : fator de crescimento transformador alfa; TNF: fator de necrose tumoral; H2AX: proteína histona da família H2A; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; MDA: malondialdeído; EGF: fator de crescimento epidermal.

Figura 21. Representação das relações entre carbonil, FOX, MDA, GSH e GSSG e o as proteínas (p16^{Ink4a}, IL-1 β , Lamin b1 e H2AX), controlando por tipo de tecido (controle, eutópico e lesão) e fase do ciclo (proliferativa e secretora)

4.16 Avaliação da relação entre concentração de citocinas como variáveis explicativa e medidas de estresse oxidativo como variáveis desfecho

Consideramos as médias ajustadas das concentrações das citocinas como variáveis explicativa e as médias ajustadas das concentrações dos marcadores de estresse oxidativo como variáveis desfecho controlando por grupo, fase de ciclo e interação entre grupo e fase. Observa-se os resultados na figura 22.

IL-1A	Carbonil	=
	FOX	=
	MDA	>
	GSH	=
	GSSG	=
IL-1B	Carbonil	=
	FOX	=
	MDA	>
	GSH	<
	GSSG	<
IL-2	Carbonil	=
	FOX	=
	MDA	=
	GSH	<
	GSSG	<
IL-4	Carbonil	<
	FOX	=
	MDA	=
	GSH	<
	GSSG	<
IL-6	Carbonil	<
	FOX	<
	MDA	=
	GSH	<
	GSSG	<
IL-8	Carbonil	<
	FOX	=
	MDA	=
	GSH	<
	GSSG	<
IL-10	Carbonil	<
	FOX	=
	MDA	=
	GSH	=
	GSSG	=
IL-15	Carbonil	<
	FOX	=
	MDA	=
	GSH	=
	GSSG	=
IL-17A	Carbonil	<
	FOX	<
	MDA	=
	GSH	<
	GSSG	=
EGF	Carbonil	>
	FOX	=
	MDA	=
	GSH	=
	GSSG	=
VEGF	Carbonil	<
	FOX	<
	MDA	=
	GSH	=
	GSSG	=
TGF-A	Carbonil	<
	FOX	<
	MDA	=
	GSH	=
	GSSG	=
TNF-A	Carbonil	<
	FOX	=
	MDA	=
	GSH	<
	GSSG	<
TNF-B	Carbonil	<
	FOX	<
	MDA	=
	GSH	=
	GSSG	=

Representação do que ocorre quando há um aumento na concentração das citocinas controlando por grupo e fase do ciclo. > indica aumento estatisticamente diferente nas concentrações. < indica diminuição estatisticamente diferente das concentrações. = valor sem significância estatística. IL: Interleucina; FOX: oxidação férrica (*ferrous oxidation*); TGF-A: fator de crescimento transformador alfa; TNF: fator de necrose tumoral; H2AX: proteína histona da família H2A; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; MDA: malondialdeído; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; EGF: fator de crescimento epidermal.

Figura 22. Representação das relações entre as citocinas e os marcadores de estresse oxidativo (carbonil, FOX, MDA, GSH e GSSG), controlando por tipo de tecido (controle, eutópico e lesão) e fase do ciclo (proliferativa e secretora)

4.17 Avaliação da relação entre as proteínas da via MAPK como variáveis explicativas e medidas de proteínas de senescência, estresse oxidativo e citocinas como variáveis desfecho

Consideramos as médias ajustadas das concentrações das proteínas da via MAPK como variáveis explicativas e as médias ajustadas das concentrações das proteínas marcadoras de células senescentes (Figura 23), dos marcadores de estresse oxidativo (Figura 24) e das citocinas (Figura 25) como variáveis desfecho controlando por grupo, fase de ciclo e interação entre grupo e fase.

ERK	p16	=	JNK	p16	=	P38	p16	=
	Lamin B1	=		Lamin B1	>		Lamin B1	=
	IL-1B	=		IL-1B	=		IL-1B	=
	H2AX	<		H2AX	=		H2AX	=
ATF2	p16	=	c-Jun	p16	=	p53	p16	=
	Lamin B1	=		Lamin B1	=		Lamin B1	=
	IL-1B	<		IL-1B	=		IL-1B	=
	H2AX	=		H2AX	=		H2AX	=
MEK1	p16	=	MSK1	p16	=	HSP27	p16	=
	Lamin B1	=		Lamin B1	=		Lamin B1	=
	IL-1B	=		IL-1B	=		IL-1B	=
	H2AX	>		H2AX	>		H2AX	=

Representação do que ocorre quando há um aumento na concentração das proteínas da via MAPK, controlando por grupo e fase do ciclo. > indica aumento estatisticamente diferente nas concentrações. < indica diminuição estatisticamente diferente das concentrações. = valor sem significância estatística. IL: Interleucina; TGF-A: fator de crescimento transformador alfa; TNF: fator de necrose tumoral; H2AX: proteína histona da família H2A; MDA: malondialdeído; ATF2: fator de transcrição ativador 2; ERK: *extracellular signal-regulated kinases*; JNK: *c-Jun NH2-terminal kinase*; STAT1: fator transdutor de sinal e ativador de transcrição 1; MEK: quinase ativadora da MAP quinase; HSP27: proteína de choque térmico 27; EGF: fator de crescimento epidermal.

Figura 23. Representação das relações entre as proteínas da via MAPK e as proteínas marcadores de senescência, controlando por tipo de tecido (controle, eutópico e lesão) e fase do ciclo (proliferativa e secretora)

ERK	Carbonil	>	JNK	Carbonil	>	P38	Carbonil	=
	FOX	=		FOX	=		FOX	=
	MDA	=		MDA	=		MDA	=
	GSH	=		GSH	>		GSH	=
	GSSG	=		GSSG	>		GSSG	=
ATF2	Carbonil	>	c-Jun	Carbonil	=	p53	Carbonil	=
	FOX	=		FOX	=		FOX	=
	MDA	=		MDA	=		MDA	=
	GSH	>		GSH	>		GSH	=
	GSSG	>		GSSG	>		GSSG	=
MEK1	Carbonil	=	MSK1	Carbonil	=	HSP27	Carbonil	>
	FOX	=		FOX	=		FOX	=
	MDA	=		MDA	=		MDA	=
	GSH	=		GSH	=		GSH	=
	GSSG	=		GSSG	=		GSSG	=

Representação do que ocorre quando há um aumento na concentração dos marcaores das proteínas da via MAPK, controlando por grupo e fase do ciclo. > indica aumento estatisticamente diferente nas concentrações. < indica diminuição estatisticamente diferente das concentrações. = valor sem significância estatística. FOX: oxidação férrica (*ferrous oxidation*); TGF-A: fator de crescimento transformador alfa; TNF: fator de necrose tumoral; H2AX: proteína histona da família H2A; MDA: malondialdeído; ATF2: fator de transcrição ativador 2; ERK: *extracellular signal-regulated kinases*; JNK: *c-Jun NH2-terminal kinase*; STAT1: fator transdutor de sinal e ativador de transcrição 1; MEK: quinase ativadora da MAP quinase; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; MSK: ; HSP27: proteína de choque térmico 27.

Figura 24. Representação das relações entre as proteínas da via MAPK e os marcadores de estresse oxidativo (carbonil, FOX, MDA, GSH e GSSG), controlando por tipo de tecido (controle, eutópico e lesão) e fase do ciclo (proliferativa e secretora)

ERK	IL-1A	<	JNK	IL-1A	<	P38	IL-1A	=
	IL-1B	=		IL-1B	=		IL-1B	=
	IL-2	=		IL-2	<		IL-2	=
	IL-4	=		IL-4	=		IL-4	>
	IL-6	=		IL-6	<		IL-6	=
	IL-8	>		IL-8	>		IL-8	=
	IL-10	=		IL-10	<		IL-10	=
	IL-15	=		IL-15	=		IL-15	=
	IL-17A	=		IL-17A	=		IL-17A	=
	TGF-A	=		TGF-A	=		TGF-A	=
	EGF	>		EGF	=		EGF	>
	VEGF	<		VEGF	=		VEGF	=
ATF2	TNF-A	<	c-Jun	TNF-A	=	p53	TNF-A	=
	TNFB	=		TNFB	=		TNFB	=
	IL-1A	=		IL-1A	=		IL-1A	>
	IL-1B	=		IL-1B	=		IL-1B	=
	IL-2	<		IL-2	<		IL-2	=
	IL-4	<		IL-4	=		IL-4	=
	IL-6	<		IL-6	=		IL-6	=
	IL-8	>		IL-8	>		IL-8	>
	IL-10	=		IL-10	=		IL-10	=
	IL-15	=		IL-15	=		IL-15	<
	IL-17A	=		IL-17A	=		IL-17A	=
	TGF-A	=		TGF-A	<		TGF-A	=
MEK1	EGF	>		EGF	=		EGF	=
	VEGF	<		VEGF	=		VEGF	<
	TNF-A	=		TNF-A	=		TNF-A	<
	TNFB	<		TNFB	=		TNFB	=
	IL-1A	<	MSK1	IL-1A	=	HSP27	IL-1A	=
	IL-1B	<		IL-1B	=		IL-1B	=
	IL-2	=		IL-2	<		IL-2	<
	IL-4	=		IL-4	=		IL-4	=
	IL-6	=		IL-6	=		IL-6	=
	IL-8	=		IL-8	>		IL-8	>
	IL-10	=		IL-10	=		IL-10	=
	IL-15	=		IL-15	=		IL-15	=
	IL-17A	=		IL-17A	=		IL-17A	=
	TGF-A	=		TGF-A	=		TGF-A	=
	EGF	=		EGF	>		EGF	=
	VEGF	=		VEGF	=		VEGF	=
STAT1	TNF-A	=		TNF-A	=		TNF-A	=
	TNFB	=		TNFB	=		TNFB	=
	IL-1A	=	FOX	IL-1A	=	MDA	IL-1A	=
	IL-1B	=		IL-1B	=		IL-1B	=
	IL-2	<		IL-2	<		IL-2	=
	IL-4	<		IL-4	=		IL-4	=
	IL-6	<		IL-6	=		IL-6	=
	IL-8	>		IL-8	>		IL-8	>
	IL-10	=		IL-10	=		IL-10	=
	IL-15	=		IL-15	=		IL-15	<
	IL-17A	=		IL-17A	=		IL-17A	=
	TGF-A	=		TGF-A	<		TGF-A	=
	EGF	>		EGF	=		EGF	=
	VEGF	<		VEGF	=		VEGF	<

Representação do que ocorre quando há um aumento na concentração das proteínas da via MAPK, controlando por grupo e fase do ciclo. > indica aumento estatisticamente diferente nas concentrações. < indica diminuição estatisticamente diferente das concentrações. = valor sem significância estatística. IL: Interleucina; FOX: oxidação férrica (*ferrous oxidation*); TGF-A: fator de crescimento transformador alfa; TNF: fator de necrose tumoral; H2AX: proteína histona da família H2A; MDA: malondialdeído; ATF2: fator de transcrição ativador 2; ERK: *extracellular signal-regulated kinases*; JNK: *c-Jun NH2-terminal kinase*; STAT1: fator transdutor de sinal e ativador de transcrição 1; MEK: quinase ativadora da MAP quinase; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; MSK1: quinase ativada por mitogeno e estresse 1 (*Mitogen- and Stress-Activated Kinase 1*); EGF: fator de crescimento epidermal; HSP27: proteína de choque térmico 27.

Figura 25. Representação das relações entre as proteínas da via MAPK e das citocinas, controlando por tipo de tecido (controle, eutópico e lesão) e fase do ciclo (proliferativa e secretora)

4.18 Avaliação da relação entre duas variáveis no fluido peritoneal

Nesta seção serão apresentados os resultados das comparações entre dois grupos de medidas (estresse oxidativo, citocinas e dano de DNA) no fluido peritoneal.

4.19 Comparação entre citocinas e estresse oxidativo

Observou-se que todos os modelos tiveram significância na interação entre grupo e fase de ciclo. Carbonil apresentou relação significativa quando considerada como variável explicativa nos modelos com TGF-A, IL-1 β , IL-2 e IL-8. Malondialdeído apresentou relação significativa quando considerada como variável explicativa no modelo com TGF-A. A tabela 25 mostra os resultados controlados por grupo, fase de ciclo e interação entre grupo e fase.

Tabela 25. Comparação das citocinas como variáveis explicativas e marcadores de estresse oxidativo como variáveis desfecho no fluido peritoneal controlando por tipo de paciente (endometriose e controle) e fase do ciclo menstrual (proliferativa e secretora)

Citocinas	RM (IC 95%)	Valor-p
EGF		
MDA (nmol/mg de proteína)	0,241 (0,003; 17,768)	0,521
carbonil (nmol/mg de proteína)	1,354 (0,012; 159,232)	0,902
TGF-A		
MDA (nmol/mg de proteína)	64,646 (8,394; 497,844)	<0,001
carbonil (nmol/mg de proteína)	226,021 (20,650; 2473,901)	<0,001
IL-10		
MDA (nmol/mg de proteína)	4,891 (0,351; 68,207)	0,246
carbonil (nmol/mg de proteína)	5,403 (0,260; 112,071)	0,283
IL-15		
MDA (nmol/mg de proteína)	1,734 (0,428; 7,037)	0,446
carbonil (nmol/mg de proteína)	0,767 (0,180; 3,263)	0,721
IL-17A		
MDA (nmol/mg de proteína)	1,115 (0,067; 18,658)	0,940
carbonil (nmol/mg de proteína)	2,391 (0,093; 61,409)	0,602
IL-1 α		
MDA (nmol/mg de proteína)	82,908 (0,017; 413848,145)	0,316
carbonil (nmol/mg de proteína)	249,409 (0,028; 2252257,816)	0,243
IL-1 β		
MDA (nmol/mg de proteína)	5,751 (0,934; 35,426)	0,068
carbonil (nmol/mg de proteína)	9,561 (1,111; 82,240)	0,048
IL-2		
MDA (nmol/mg de proteína)	3,380 (0,882; 12,952)	0,085
carbonil (nmol/mg de proteína)	5,673 (1,167; 27,586)	0,039
IL-4		
MDA (nmol/mg de proteína)	0,014 (<0,001; 21,271)	0,262
carbonil (nmol/mg de proteína)	0,002 (<0,001; 2,134)	0,091
IL-6		
MDA (nmol/mg de proteína)	59,910 (0,299; 12023,362)	0,140
carbonil (nmol/mg de proteína)	56,971 (0,161; 20179,437)	0,186

continua...

...continuação

IL-8		
MDA (nmol/mg de proteína)	14,677 (0,569; 378,454)	0,114
carbonil (nmol/mg de proteína)	6426,727 (313,334; 131817,139)	<0,001
TNF-A		
MDA (nmol/mg de proteína)	1,716 (0,359; 8,207)	0,503
carbonil (nmol/mg de proteína)	2,452 (0,356; 16,867)	0,369
TNF-B		
MDA (nmol/mg de proteína)	0,001 (<0,001; 2,511)	0,091
carbonil (nmol/mg de proteína)	<0,001 (<0,001; 0,962)	0,057
VEGF		
MDA (nmol/mg de proteína)	0,453 (<0,001; 1891,285)	0,853
carbonil (nmol/mg de proteína)	66,864 (0,006; 780167,004)	0,385

RM: razão de médias; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; categorias de referência: grupo controle e fase secretora. IL: Interleucina; TGF-A: fator de crescimento transformador alfa; TNF: fator de necrose tumoral; MDA: malondialdeído; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular.

4.20 Comparação entre dano de DNA e estresse oxidativo

Avaliamos a relação entre MDA e carbonil com 8-OHdG controlando por grupo e por fase do ciclo. Apesar de não termos evidências de relação significativa, o aumento de uma unidade de 8-OHdG está associado a um aumento estimado de 34% na média de concentração de MDA e a um aumento estimado de 15,4% na média de carbonil. A tabela 26 mostra os resultados da medida de dano de DNA dosado através da concentração de 8-OHdG e as medidas de estresse oxidativo como variáveis desfecho.

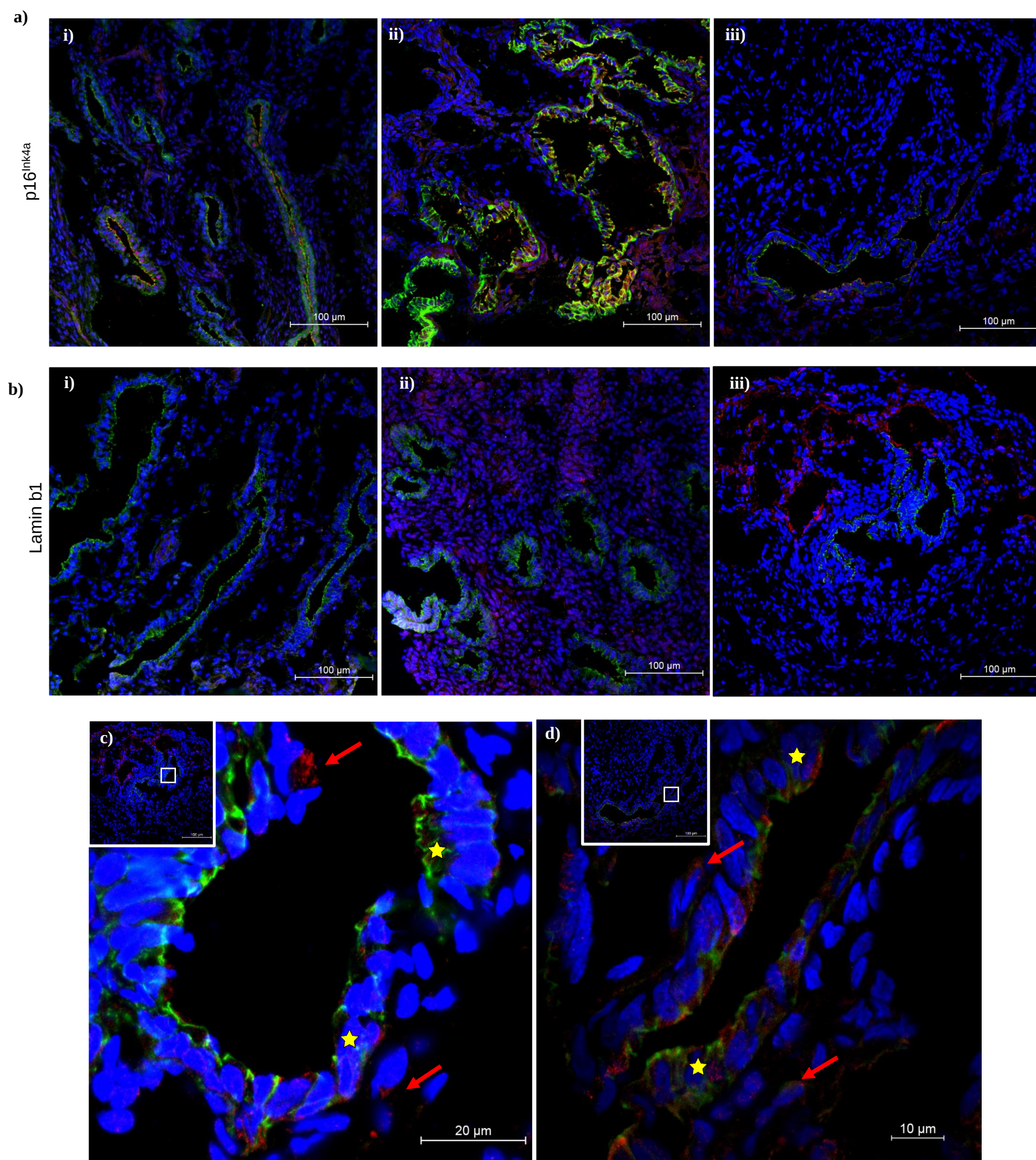
Tabela 26. Comparação dos marcadores de estresse oxidativo como variáveis desfecho e 8-OHdG como variável explicativa no fluido peritoneal controlando por tipo de paciente (endometriose e controle) e fase do ciclo menstrual (proliferativa e secretora)

Marcadores de estresse oxidativo (ng/mL de fluido peritoneal)	RM (IC 95%)	Valor-p
MDA		
8-OHdG	1,340 (0,993; 1,808)	0,064
carbonil		
8-OHdG	1,154 (0,973; 1,368)	0,109

RM: razão de médias; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; variáveis de controle: grupo e fase. Valores-p obtidos via modelos lineares generalizados mistos. 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina; MDA: malondialdeído.

4.21 Avaliação da colocalização das células senescentes

Após a avaliação dos marcadores de estresse oxidativo e de senescência nas lesões de endometriose, buscamos localizar qual o tipo celular que envolvido. Para isso, realizamos experimentos de colocalização de imunofluorescência, utilizando os anticorpos anti-p16^{Ink4a} e anti-ecaderina, e também da proteína Lamin b1 e anti-ecaderina, marcador de célula epitelial. Fica ilustrado aqui a marcação para p16^{Ink4a} (Figura 26 a; c) e Lamin b1 (Figura 26 b; d) com e-caderina nos três grupos: endométrio controle, eutópico e lesão. Nossa análise qualitativa nos mostrou que tanto células epiteliais, quanto não epiteliais foram positivas para p16^{Ink4a} e Lamin b1.



a) Imagens representativas de p16^{Ink4a} e b) Lamin b1 co-marcadas com e-caderina (marcador de células epiteliais) em tecidos de endometriose e controles. A cor vermelha representa as áreas marcadas pelos anticorpos anti-p16^{Ink4a} e anti-Lamin b1, a cor verde representa a coloração da e-caderina nas células epiteliais e a cor azul marca os núcleos das células. i) endométrio controle; ii) endométrio eutópico; iii) lesões de endometriose. As fotos foram tiradas usando o microscópio confocal Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha) modelo LSM 710 com aumento de 20X, e o software Zen 2010 foi usado para análise de imagem. c) Imagens representativas de p16^{Ink4a} e d) lamina b1 co-corada com e-caderina em tecidos com lesões profundas de endometriose. A cor vermelha representa as proteínas p16^{Ink4a} e Lamin b1, a cor verde representa a coloração de e-caderina nas células epiteliais e a cor azul marca os núcleos das células. A seta vermelha mostra células que são coradas apenas para p16^{Ink4a} ou Lamin b1, e a estrela amarela mostra células epiteliais coradas para p16^{Ink4a} e Lamin b1. As fotos foram tiradas usando o microscópio confocal Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha) modelo LSM 710 em ampliações de 20X e 100X e analisadas usando o software Zen 2010.

Figura 26. Colocalização da marcação da proteína p16^{Ink4a} e Lamin b1 co-marcados com e-caderina em tecido de endometriose

5 DISCUSSÃO

Nosso objetivos foram verificar a presença de células senescentes, marcadores de estresse oxidativo, SASP e as principais proteínas da via MAPK em células de lesão de endometriose profunda e endométrio de mulheres com endometriose. Demonstramos com os resultados obtidos no presente estudo, que a lesão apresenta características de expressão de marcadores pró senescência (p16^{Ink4a}, Lamin b1 e IL-1 β), havendo uma alteração nos marcadores de estresse oxidativo (H2AX, 8-OHdG, carbonil, FOX, GSH e GSSG) e citocinas (IL-4, IL-10, IL-15), além de desregulação da fosforilação de quinases (ERK, JNK, p38 e MEK1) e fatores de transcrição (ATF-2, p53 e STAT1) da via MAPK.

A senescência celular é caracterizada pelo estado de bloqueio permanente do ciclo celular provocado por estímulos intrínsecos e extrínsecos da célula.⁽¹⁴⁶⁾ O acúmulo de células senescentes em um determinado órgão ou tecido pode favorecer o ambiente pró-inflamatório, diminuir a capacidade de regeneração celular, favorecendo o aparecimento de diversas doenças, como o câncer, doenças degenerativas e síndromes do envelhecimento.⁽³³⁾ As principais características fenotípicas da senescência celular são a liberação de citocinas pró-inflamatórias, expressão de genes anti-apoptose e oncogenes, alteração nas taxas metabólicas, dano de DNA (de forma crônica), aumento de volume e aparência alongada das células, entre outros.⁽¹⁴⁷⁾ Até o momento não há descrito na literatura a utilização de um único marcador de senescência, porém a utilização de diferentes moléculas, conhecidas por estarem alteradas em células senescentes, garante uma caracterização do potencial senescente daquele tecido,⁽¹⁴⁸⁾ como reguladores do ciclo celular: p16^{Ink4a}⁽¹⁴⁹⁾ e p53;⁽¹⁵⁰⁾ marcadores de dano de DNA: H2AX,⁽¹⁵¹⁾ 8-OHdG,⁽¹⁵²⁾ citocinas características do fenótipo secretor associado a senescência: IL-1 β ⁽¹⁵³⁾ e Lamin b1.⁽¹⁵⁴⁾

No presente estudo foi identificado, através de análises de imunoistoquímica, um aumento na expressão de p16^{Ink4a} nas lesões em relação ao endométrio eutópico na fase secretora. A proteína p16^{Ink4a} tem um papel crítico no controle de envelhecimento, da regulação da senescência celular, detecção e manutenção de danos ao DNA, sendo um potente inibidor da proliferação celular.⁽¹⁵⁵⁾ O acúmulo de células senescentes em tecidos envelhecidos pode ser observado através da presença da proteína p16^{Ink4a}.⁽¹⁴⁹⁾ O crescente potencial senescente foi associado

com o aumento de p16^{Ink4a} em câncer ovariano, tumor endometriótico e também cisto endometriótico.⁽¹⁵⁶⁾

A maior expressão de p16^{Ink4a} nas lesões profundas em relação ao endométrio eutópico, nos indica que as células das lesões passam por alterações funcionais. São células mais propensas ao bloqueio do ciclo celular. Essas células senescentes da lesão seriam mais resistentes à apoptose, passariam a secretar metabólitos distintos do que as células do endométrio eutópico, se comportariam em relação ao microambiente de forma diferente, inclusive no recrutamento de outras células do sistema imune. Essa observação é condizente com as características da doença, que possui características anti-apoptóticas,⁽¹⁵⁷⁾ alterações no perfil de resposta inflamatória com maiores de concentrações de citocinas pró-inflamatórias,⁽¹⁵⁸⁾ e aumento de estresse oxidativo em relação ao tecido endometrial.⁽¹⁵⁹⁾

Nossos resultados anteriores já haviam demonstraram uma diminuição na expressão de Lamin b1 em lesões, quando comparado ao endométrio eutópico das mesmas pacientes, sem considerar as diferentes fases do ciclo.⁽²⁴⁾ Os resultados atuais, através de análises de imunoistoquímica, identificaram uma diminuição significativa na expressão de Lamin b1 em relação ao endométrio eutópico na fase proliferativa. Lamin b1 é uma proteína encontrada na membrana nuclear de todas as células.⁽¹¹⁹⁾ Ela está associada à manutenção da estruturação da membrana nuclear, além de participar de outros processos do ciclo celular, como replicação de DNA e organização da cromatina.⁽¹²⁰⁾ Na literatura, baixos níveis de Lamin b1 estão associados com a síndrome prematura de envelhecimento Hutchinson-Gilford.⁽¹²¹⁾ Estudos recentes mostram que a redução de Lamin b1 está associada com o aumento da senescência em células humanas.^(160–163)

Diversos estudos já demonstram a relação que Lamin b1 tem com o acúmulo de células senescentes. A literatura não indica uma causa ou consequência da depleção de Lamin b1 à senescência celular, porém, observa-se que células senescentes apresentam baixos níveis de tais proteínas.^(122,123) Outro estudo⁽¹²⁴⁾ demonstrou que, após irradiação em camundongo, havia mais células em senescência e que as concentrações de Lamin b1 diminuíram inversamente ao aumento do número de células senescentes marcadas.

Avaliamos também a localização dos marcadores de senescência no tecido, dando foco às células epiteliais glandulares. Observamos que a marcação de p16^{Ink4a} e Lamin b1 dá-se com maior intensidade nas células epiteliais, entretanto foi

possível observar fluorescência em células não epiteliais. Isso demonstra que a senescência celular não está restrita a um compartimento celular e acaba por atingir diversos tipos celulares, mostrando que a lesão e tecido adjacente a ela podem estar alterados.

Ocorre naturalmente nas células, após entrarem em bloqueio do ciclo celular pela via do p16^{Ink4a}, uma ativação do fator de transcrição NF- κ B, que por sua vez, leva a um aumento da liberação de IL-1, IL-6, IL-8, entre outros fatores, mais conhecidos como SASP.⁽¹⁶⁴⁾ Concomitante a isso, foi demonstrado que células tratadas com IL-1 β tiveram um acúmulo de p16^{Ink4a}.⁽¹⁶⁵⁾ Outro estudo sugere o envolvimento do aumento de IL-1 β na ativação da via p38 MAPK de senescência celular em fibroblastos embrionários de camundongos.⁽¹²⁹⁾ Por esses motivos optamos por avaliar, através de análises de imunoistoquímica, a expressão proteica de IL-1 β nos tecidos de endometriose como um marcador de senescência.

Nossos resultados demonstram um aumento na expressão de IL-1 β na lesão, quando comparamos ao endométrio eutópico, em ambas as fases do ciclo. A IL-1 β é um mediador chave na resposta inflamatória crônica e aguda, identificado como marcador de estresse celular.⁽¹⁶⁶⁾ IL-1 α e IL-1 β são componentes conhecidos do SASP⁽¹²⁵⁾ e são as principais proteínas precursoras que se ligam a IL-1R1. IL-1 α e 1 β ativados iniciam uma cascata de sinalização que leva à translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B, levando a vários efeitos imunológicos, como a produção e secreção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, além de, regulação positiva de moléculas de adesão, aumento da permeabilidade vascular, e proliferação de células T efectoras na presença de células T reguladoras.^(126,127)

Demonstramos que as lesões de endometriose exibiram maior expressão de IL-1 β do que o endométrio eutópico, corroborando nossa hipótese de expressão do marcador de senescência regulada positivamente em lesões de endometriose. Embora a IL-1 seja um componente secundário do SASP, é responsável por iniciar uma cascata de eventos que, em última análise, leva à secreção de IL-6 e IL-8, sendo que ambos são componentes principais do SASP.⁽¹²⁸⁾ Neste estudo, embora não tenhamos encontrado nenhuma diferença nos níveis de IL-6 e IL-8 entre as lesões de endometriose e o endométrio eutópico, notamos uma alteração na expressão IL-1 β nos tecidos, sugerindo a presença de um processo inflamatório.

Achados diferentes aos nossos foram publicados por Volpato et al. 2018. Nesse trabalho, os autores não foram capazes de encontrar diferença entre a

expressão de IL-1 β nas pacientes com e sem endometriose.⁽¹⁶⁷⁾ Com isso, acreditamos que a elevação de IL-1 β nas lesões de endometriose vai de acordo com outros resultados apresentados na literatura⁽¹⁶⁸⁾ e pode estar associada com o perfil inflamatório e a presença de dor nessas pacientes.⁽¹⁶⁹⁾

Por acreditarmos que a senescência celular na endometriose é induzida por estresse avaliamos também o equilíbrio redox nas pacientes com e sem endometriose. A avaliação desse equilíbrio depende da comparação entre espécies reativas de oxigênio (ERO) e também do sistema antioxidante, no caso desse estudo, antioxidantes enzimáticos.

Demonstramos com os resultados obtidos, que nas lesões, em ambas as fases do ciclo, há um aumento na peroxidação lipídica e formação de hidroperóxidos, que foram detectados através do método de dosagem de FOX e aumento da oxidação proteica dosada através do marcador carbonil nos tecidos.

Proteínas oxidadas são adicionadas de um grupo carbonil (as chamadas proteínas carboniladas) e a dosagem desse grupo é o indicador mais comumente utilizado para avaliar oxidação proteica.⁽¹⁴³⁾ Observamos um aumento na concentração de carbonil nas lesões em relação ao endométrio eutópico, entretanto, também um aumento no endométrio controle e fluido peritoneal de pacientes controle. As concentrações de carbonil no fluido peritoneal ainda são contraditórias, e os estudos diferem em relação à técnica utilizada para dosagem do composto, além da seleção das pacientes, o que dificulta a comparação entre os trabalhos. Diferentemente dos nossos resultados, foi demonstrado um aumento de carbonil, no fluido peritoneal de mulheres com e sem endometriose,⁽¹⁷⁰⁾ já outra pesquisa não encontrou diferença entre esse composto no fluido peritoneal de pacientes com e sem a doença.⁽²⁸⁾

Nosso trabalho avaliou a relação da peroxidação lipídica, representado pela dosagem de FOX, em sítios específicos nos tecidos de endometriose (endométrio e lesão) e também no endométrio de pacientes sem endometriose, com o intuito de avaliar a presença de radicais livres (RL) e com isso entender o ambiente da lesão, relacionando essas alterações locais com uma concentração maior de marcadores de senescência e possível manutenção da doença. Observamos um aumento de FOX nas lesões em ambas as fases do ciclo menstrual.

Resultados semelhantes aos nossos já haviam sido demonstrados, entretanto as dosagens dos hidroperóxidos foram realizadas no plasma, fluido folicular e fluido peritoneal. Os autores observaram um aumento significativo de FOX no plasma

das mulheres com endometriose comparado a mulheres sem a doença, demonstrando aqui uma alteração sistêmica.⁽¹⁷¹⁻¹⁷³⁾ Outro trabalho não encontrou diferença na concentração de hidroperóxidos entre pacientes com e sem endometriose, mas observou um aumento no fluido peritoneal.⁽¹⁷⁰⁾ Já a diferença na concentração de hidroperóxidos no fluido folicular de pacientes com endometriose que foram submetidas à estimulação ovariana não foi significativa.⁽¹⁷¹⁾

As membranas celulares são formadas basicamente por camadas de lipídios (fosfolipídios e colesterol) e proteínas, sendo altamente fluidas. Os danos oxidativos causados por ERO podem resultar na alteração da fluidez dessas membranas, modificando a estrutura celular.^(141,174) Acreditamos que, essa elevação na peroxidação lipídica em lesões de endometriose, além de alterar o equilíbrio redox, possa estar atuando na membrana celular, o que levaria a modificações na estrutura, fluidez, permeabilidade, transporte e antigenicidade dessas células. Essas mudanças poderiam ter implicações importantes na manutenção da endometriose. Alterações na fluidez da membrana afetam várias funções celulares, incluindo o transporte ativo e passivo, atividades enzimáticas, processos de transdução de sinal induzido por hormônio, crescimento e divisão celular.⁽¹⁷⁵⁾

Constata-se, há tempos, que os níveis de fluidez da membrana estão envolvidos no envelhecimento e em várias doenças.⁽¹⁷⁶⁾ Um modelo de roedor avaliou a fluidez da membrana celular em animais modificados para serem resistentes à senescência e outro grupo suscetíveis à senescência (acelerada pelo estresse oxidativo), em um período de cinco meses. Eles demonstraram que a fluidez da membrana era menor em animais suscetíveis à senescência, em comparação àqueles que eram resistentes com o passar do tempo.⁽¹⁷⁷⁾ Por isso, acreditamos que o estresse oxidativo somado a um processo de senescência celular, pode comprometer a estrutura da membrana celular na endometriose e com isso afetando funções originais das células.

Como a fluidez da membrana depende das interações dos lipídios presentes nela, pesquisadores aferiram a fluidez da membrana celular em transplante de pâncreas através da concentração de malondialdeído (MDA) e compararam com um teste padrão de fluidez de membrana. O que observaram foi que a maior concentração de MDA estava relacionada a uma menor fluidez da membrana.⁽¹⁷⁵⁾

O MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica e também pode ser utilizado para avaliar a taxa cumulativa de peroxidação lipídica nas células, entretanto, não encontramos diferença entre a lesão e o endométrio eutópico. Outros

trabalhos também não encontraram diferenças na concentração sérica e do fluido folicular de MDA entre endometriose e um grupo controle, sem observar alteração entre diferentes estádios da doença.^(171,173)

As análises da proteína γ -H2AX, um marcador sensível para quebra de dupla fita de DNA, indicando dano de DNA, mostraram que as lesões de endometriose, em ambas as fases do ciclo, expressaram menos proteína, em comparação com o endométrio eutópico. O aumento da marcação de γ -H2AX pode indicar uma disfunção no telômero, sugerindo que em células com aumento de γ -H2AX, a senescência seja replicativa e dependente do encurtamento do telômero. Essa análise nos leva a crer que a senescência na endometriose não estaria associada à replicação celular e encurtamento dos telômeros,⁽¹¹²⁾ mas sim senescência mediada por estresse. Esse dado vai de acordo com os resultados obtidos no estudo, como aumento de p16^{Ink4a} e IL-1 β e diminuição de Lamin b1 nas lesões, que estaria associado ao bloqueio do ciclo celular.

Para neutralizar os RL os deixando menos tóxicos para as células existe um sistema complexo formado pelos antioxidantes. O sistema antioxidante é composto por diversas moléculas capazes de transformar radicais livre em substâncias menos reativas, que podem ser eliminadas pelo próprio organismo. Dentre elas existe o sistema composto pela glutathiona peroxidase (GSH-Px), GSSG pela glutathiona redutase (GR) e outras enzimas de suporte (glutathiona oxidase e glutathiona peroxidase).⁽¹⁷⁸⁾ O sistema glutathiona, é um importante componente antioxidante.⁽¹⁷⁹⁾ A GSH-Px catalisa a dismutação de H₂O₂ em H₂O e peróxidos orgânicos e então se transforma em uma forma reduzida (GSSH), que é regenerada pela GR, recomeçando o ciclo da glutathiona.⁽¹⁸⁰⁾

Avaliamos a concentração das enzimas antioxidantes entre o endométrio eutópico e a lesão. Nossos resultados mostram que há uma maior concentração de GSH e GSSG em lesões comparados ao endométrio eutópico. Acreditamos que esse aumento de GSH e GSSG estão relacionados com a necessidade de se neutralizar RL presentes na lesão em maior quantidade,⁽¹⁸¹⁾ demonstrando um aumento na concentração de ERO na lesão em relação ao endométrio eutópico, aumentando o aporte de antioxidantes. Além disso, como a GSH-Px tem um papel importante na proliferação celular, através do auxílio no fornecimento de NADPH para a célula, assim como maiores níveis de GSH-Px estão associados à resistência a apoptose,⁽¹⁸²⁾ uma característica tanto das células senescentes quanto da endometriose. O aumento de GSH também está associado com a diminuição da velocidade da

senescência replicativa em células epiteliais.⁽¹⁸³⁾ A hipótese que formulamos é a presença de maior concentração de marcadores de senescência na lesão e que esse acúmulo estaria relacionado com o aumento do estresse oxidativo, ou seja, senescência induzida por estresse. Portanto, uma possível ligação do sistema antioxidante e dos RL com o acúmulo de marcadores de células senescentes nas lesões de endometriose pode nos ajudar a entender a relação entre o estresse oxidativo, a concentração de GSH-Px e a possível senescência celular como manutenção da lesão.

Para comparar as diferenças entre a concentração dos antioxidantes em relação as ERO produzidas, avaliamos razão entre as ERO e os antioxidantes. Dessa forma, conseguimos observar que, no endométrio eutópico comparado à lesão, há um aumento da taxa relativa de ERO em relação ao carbonil e a GSH, ou seja, há uma maior liberação de carbonil ou menor liberação de GSH no endométrio eutópico, quando comparado com a lesão da mesma paciente na mesma fase do ciclo. Esses resultados, juntamente com os apresentados anteriormente, ou seja, menor concentração de carbonil no endométrio eutópico em comparação à lesão e menor concentração de GSH/GSSG comparado ao endométrio controle, nos fazem acreditar que no endométrio eutópico há menor liberação de antioxidante para combater o estresse oxidativo gerado.

Até o presente momento, ao que consta na literatura, nenhum estudo avaliou as concentrações de hidroperóxidos (FOX e MDA), carbonil ou GSH e GSSG em lesão. Nosso estudo mostrou pela primeira vez as concentrações encontradas nas lesões profundas retrocervicais de produtos capazes de avaliar o equilíbrio redox nas pacientes com endometriose, e como a relação entre eles está se mantendo.

Nossos resultados mostram que há um aumento de IL-4 e diminuição de IL-1 β e IL-15 na lesão durante a fase proliferativa e diminuição de IL-2, IL-10 e IL-15 (entre outras) na fase secretora. Vimos também que o endométrio eutópico, em relação ao endométrio controle expressa na fase proliferativa, menor concentração de IL-17A e IL-2, maior concentração de IL-4, IL-1 β e IL-15, assim como expressa menos IL-17A, e mais IL2 e IL-4 na fase secretora.

Notamos que em ambas as fases do ciclo há um aumento de IL-4 nos tecidos de endometriose e diminuição de IL-2 e IL-15 nas lesões. IL-2 e IL-15 são citocinas típicas da resposta Th1, enquanto que IL-4 é uma citocina típica da resposta Th2.⁽¹⁸⁴⁾ A IL-4 inibe a ativação de células Th1 pela IL-2 e auxilia no aumento de liberação de estrógeno (estimulante de lesões de endometriose), além disso IL-4 estimula a ativação da via p38 MAPK.⁽¹⁸⁵⁾ Diversos estudos já demonstraram a importância da IL-4

e resposta Th2 na endometriose.^(186–188) Um aumento na razão de IL-4/IL-2 é uma forma de avaliar a razão Th1/Th2 entre células T. Sabemos que a razão entre IL-4/IL-2 está significativamente aumentada em fluido peritoneal de pacientes com endometriose⁽¹⁸⁶⁾ e que isso pode estar relacionado com o aumento da resposta Th2. Demonstramos no nosso trabalho um aumento na razão IL-4/IL-2 tanto na lesão em relação ao endométrio eutópico quanto no endométrio eutópico em relação ao controle, reforçando a presença da resposta Th2 na endometriose. Estudo recente revelou, apesar do número pequeno de pacientes, que o fluido peritoneal de mulheres com endometrioma exercem uma influência imunoreguladora em células T CD4⁺ suprimindo a secreção IL-2, IFN- γ , IL-17A e TNF e estimulando a liberação de IL-4 e IL-10,⁽¹⁸⁹⁾ demonstrando mais uma vez a tendência de ativação da resposta Th2 na endometriose. Nosso estudo também destaca importantes diferenças encontradas no fluido peritoneal dessas mulheres, com alteração na composição das citocinas que banham as lesões endometrióticas na cavidade peritoneal, como diminuição de TGF- β , IL-15, IL-1 β , IL-2 e TNF- α . Entretanto, não vimos alteração em algumas citocinas clássicas, como IL-6 e IL-18, que possuem vasta literatura. Outro estudo recente utilizando a mesma metodologia de avaliação e utilizando protocolos de árvores de decisão, não foi capaz de separar pacientes com e sem endometriose baseados nas análises das citocinas presentes no plasma, indicando potencial limitante de avaliação no soro.⁽¹⁹⁰⁾

Interessante relacionar a presença de resposta tipo Th2 e a senescência celular. Foi observado em pulmão de camundongo CXCR3^{-/-} (receptor de quimiocinas preferencialmente expresso por células Th1) que com o aumento da resposta Th2 nesses camundongos, houve a aceleração do processo de senescência celular.⁽¹⁹¹⁾

O processo conhecido como imunossenescência é caracterizado por múltiplas alterações do sistema imune durante o envelhecimento, consequentemente alterações nas respostas inata e adaptativas, como alteração da resposta Th1 para Th2, diminuição de IL-2 pelas células T e aumento de citocinas pró-inflamatórias.⁽¹¹⁷⁾ Essas características também estão presentes na endometriose.^(26,74,192–194) Encontramos uma alteração na composição das citocinas tanto na lesão (aumento de IL-4 na fase proliferativa, diminuição de IL-2 e IL-10 na fase secretora) quanto no endométrio eutópico (aumento de IL-4 e IL-15 e diminuição de IL-17A em ambas as fases) e fluido peritoneal (diminuição de IL-15, IL-1 β , IL-2 e TNF- α) de pacientes com endometriose. Não sabemos, porém, se essas alterações são uma causa ou consequência da doença e qual

sua relação com o aumento dos marcadores de senescência celular, mas acreditamos que essas alterações estão associadas com a produção alterada de metabólitos (SASP) pelas células senescentes presentes na lesão e no endométrio eutópico.

Ao analisarmos as discrepâncias encontradas entre o endométrio eutópico e o controle, notamos algumas diferenças importantes. O endométrio eutópico na fase proliferativa em comparação ao controle está secretando em menores quantidades IL-2 e IL-17A, ao mesmo tempo em que produz mais IL-1 β , IL-4 e IL-15. IL-1 β e IL-15 são citocinas que favorecem o microambiente inflamatório.⁽¹⁹⁵⁾ A diminuição de IL-2 e IL-17A poderia indicar um menor recrutamento de células T e células B para o endométrio, ao mesmo tempo em que se tornariam mais susceptíveis às infecções bacterianas. O aumento de IL-1 β pode levar ao aumento da produção de IL-15, que por sua vez estimula a produção de IL-1, INF- γ , IL-6 e TNF-A, estimula o recrutamento de células *natural killers* (NK) e a atividade citotóxica das células T CD8⁺, criando então, um microambiente inflamatório na fase proliferativa.⁽¹⁹⁶⁾ Essas alterações no comportamento celular podem fazer parte do SASP no endométrio eutópico proliferativo. Pouco se sabe dos mecanismos que iniciam e mantêm o SASP, entretanto, sabe-se que a IL-1 β faz parte desse fenótipo, mesmo que em quantidades menores que outras citocinas ou quimiocinas.⁽¹⁹⁷⁾

Avaliando a relação entre os marcadores dosados, demonstramos que o acréscimo em uma unidade de IL-2, IL-IL-10, IL-15, IL-17A entre outras citocinas e quimiocinas diminui o carbonil. Ao mesmo tempo, quando há o aumento de uma unidade de TGF-A, TNF-A e B, IL-6, IL-17A há também a diminuição de FOX. Todas essas citocinas estão diminuídas nas lesões de endometriose em ambas as fases do ciclo ou pelo em uma das fases, enquanto o carbonil e FOX estão aumentados em ambas as fases. Dentre as citocinas que podem alterar inversamente podemos citar a diminuição de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, e TNF-A, que aumenta uma unidade de GSH e GSSG. Destas, a IL-1 β , IL-2 e IL-4 estão aumentadas no endométrio eutópico, ao mesmo tempo que observamos uma diminuição de GSH e GSSH nesse tecido. Já na lesão há uma diminuição de IL-2, IL-6 e IL-10 na fase secretora e um aumento de GSH e GSSG. Observamos um movimento conciso entre as concentrações de marcadores de estresse oxidativo e citocinas nos tecidos de endometriose. O aumento do estresse oxidativo e a desorganização metabólica nos tecidos de endometriose podem favorecer o ambiente inflamatório e estressor para ativação da via MAPK e consequente movimento das células em prol da senescência.

Estudos recentes^(99,198–200) vem demonstrando cada vez mais a importância da via MAPK na endometriose. Suas principais quinases estão desreguladas⁽²⁰¹⁾ evidenciando um papel central na regulação da resposta imunológica, com o aumento da expressão de ERK1/2 em células estromais de lesão e endométrio eutópico,⁽⁹⁸⁾ inclusive quando há estimulação por moléculas estressoras, como H₂O₂ (ERO)⁽⁹³⁾ e também sua relação com um dos principais sintomas, a dor pélvica, demonstrando que a inibição de ERK1/2 reduz a expressão de P2X3, um receptor sensorial.^(97,202,203)

Na senescência, a estimulação aguda de fibroblastos com irradiação aumentou a expressão de p38MAPK, uma das principais quinases da via MAPK e sua proteína final HSP27. Os autores afirmaram que, apesar de responder apenas ao estresse agudo, a p38MAPK possui uma cinética de ativação semelhante ao de SASP.⁽²⁰⁴⁾ Já ERK-p38MAPK-STAT3 regulam a síntese de óxido nítrico em células senescentes controlando infecção bacteriana.⁽²⁰⁵⁾

Corroborando com o apresentado na literatura, encontramos de maneira geral um aumento na expressão das principais quinases fosforiladas da MAPK. Há um aumento de ERK1/2, JNK e p38 e a proteína final da via STAT1 nas lesões na fase proliferativa e a fase secretora apresenta aumento de ERK1/2 e STAT1 em relação ao endométrio eutópico na mesma fase.

Até o momento, o envolvimento da MAPK na endometriose estaria relacionado com processos de regulação celular como proliferação, diferenciação, inflamação, migração, resposta à estresse e apoptose.⁽²⁰⁰⁾ Queremos relacionar os mecanismos de ativação da via MAPK com o processo de senescência que estaria ocorrendo nas células da lesão. Postulamos que o aumento na expressão de ERK, JNK e p38MAPK seria um dos mecanismos de controle do ciclo celular e entrada das células em um processo de senescência. Já foi demonstrado que através da ativação de fatores de transcrição e consequente aumento de p16^{Ink4a}, as células T se mantiveram estacionadas na fase G1 em permanente estado de senescência.⁽²⁰⁶⁾

Com isso, nos questionamos se estariam os linfócitos T senescentes na endometriose e por isso haveria um desequilíbrio entre as respostas tipo Th1/Th2 e Th17 na endometriose facilitando a adesão, migração e proliferação das células ectópicas na cavidade peritoneal. O bloqueio do ciclo celular em células T não está associado ao encurtamento do telômeros, e sim senescência ativada por estresse ou quebra de dupla fita de DNA.⁽²⁰⁶⁾

Acreditamos que na endometriose, o aumento de estresse oxidativo está associado com a maior fosforilação da via MAPK. Vimos que o aumento de carbonil está relacionada com o aumento de ERK1/2, JNK, ATF2 HSP27, e STAT1. As citocinas produzidas por essas células desreguladas contribuiriam com o SASP e aumento da inflamação local, criando um *feedback* positivo de alteração celular, considerando que observamos uma relação entre as citocinas e as quinases, como aumento de IL-4 e o aumento de p38MAPK.

Vamos aqui extrapolar os resultados para verificar a relação entre os marcadores de senescência, as citocinas, estresse oxidativo e a via MAPK na lesão. A lesão apresenta maior concentração de p16^{Ink4a} e IL-1 β na fase secretora. Nessa mesma fase, as lesões também apresentam menores concentrações de IL-2, IL-6, IL-10 e IL-15, ao mesmo tempo que tem elevado o estresse oxidativo, com maiores concentrações de carbonil e FOX e menor proporção de GSH em relação ao carbonil. Na fase secretora também observamos um aumento na fosforilação de ERK1/2 e STAT1. Já na fase proliferativa, temos o aumento de IL1B, diminuição de Lamin b1, assim como maior concentração de IL-4 e menor concentração de IL-15. Observamos na fase proliferativa aumento de carbonil e FOX e por fim maior fosforilação de ERK1/2, JNK, p38MAPK e STAT1. Esse cenário parece ser propício para o *turnover* das células para a senescência, com um perfil estressante e mais inflamatório. O aumento do estresse oxidativo e da inflamação de um tecido pode levar à sua posterior regeneração através do recrutamento de células como macrófago e células NK,⁽²⁰⁷⁾ e para entender o que poderia estar ocorrendo nas lesões de endometriose precisamos primeiro entender o processo normal de regeneração celular.

As mudanças celulares causadas por um dano celular ou invasão de um patógeno ativam uma resposta intracelular através da ativação do fator de transcrição NF- κ B induzindo a expressão de diversas citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e TNF).⁽²⁰⁸⁾ Tais citocinas levam a indução da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, que por sua vez são as responsáveis por recrutar as células de defesa do sistema imune, como neutrófilos e monócitos.⁽²⁰⁹⁾ Essas células criam então, um ambiente com maior concentração de EROs e ERNs. Ao mesmo tempo que as EROs e ERNs defendem a célula contra patógenos, estas podem causar um dano irreversível na célula, levando ao dano tecidual. Para eliminar as células danificadas e/ou *debris*, os monócitos se transformam em macrófagos e também há recrutamento de células T citotóxicas e células B.⁽²¹⁰⁾

Toda essa alteração no comportamento das células e na secreção de citocinas e quimiocinas que ativarão e recrutarão as células do sistema imune exigem uma mudança comportamental nas células, uma adaptação celular à lesão por ela sofrida. A sinalização inflamatória causa alterações epigenéticas aumentando a acessibilidade ao DNA, através do aumento do NF- κ B ou outros fatores de transcrição, abrindo seu arsenal genético em resposta a uma ameaça. Para que isso ocorra, as células precisam sair do seu estado de quiescência, estado basal inativo, onde a célula estaria exercendo uma função específica, para se tornarem células que executem novas funções, levando a remodelação tecidual, diferenciação celular e por fim, regeneração tecidual.^(210,211)

Extrapolando este conceito para as lesões de endometriose, tem-se que as células das lesões expressam mais p16^{Ink4a} e IL-1 β e menos Lamin b1. O microambiente da lesão é mais oxidativo e possui características inflamatórias. Essas características estariam, através da ativação da via MAPK, levando as células a entrarem em senescência. A senescência, por sua vez, alteraria a resposta inflamatória através do SASP (no caso dos resultados obtidos aqui, alteração na expressão de diversas citocinas). Essa alteração do perfil inflamatório resultaria na alteração do recrutamento das células do sistema imune, mudando o padrão de resposta inflamatória. Neste cenário das lesões, as células senescentes das lesões estariam com seu poder de transformação fenotípica reduzido, resultando em um microambiente com um perfil de células inflamatórias diferente daquele encontrado no tecido eutópico e no controle, potencializado com o aumento do estresse oxidativo. Essa falta de transformação fenotípica poderia ser a causa da manutenção da endometriose sem intervenção das células do sistema imune com o intuito de eliminar as células danificadas.

Os eventos celulares que estariam ocorrendo nas lesões nos levam a crer que as lesões apresentam uma resposta inflamatória insuficiente para o recrutamento de macrófagos, leucócitos e outras células do sistema imune adaptativo. A ausência de uma resposta inflamatória adequada poderia ser consequência do aumento ou acúmulo de células em senescência na lesão, que deixariam de responder aos estímulos provocados pelo aumento do estresse oxidativo local. Isso tornaria o sítio da lesão, um microambiente propício para a estabilização da lesão e sua manutenção, através da secreção basal de citocinas inflamatórias e aumento do estresse oxidativo.

Na avaliação de três marcadores de senescência, colocalização de dois marcadores de senescência, dosagem de 14 citocinas, 5 marcadores de estresse

oxidativo e principais proteínas da via MAPK, observamos um microambiente complexo na lesão. As células senescentes produzindo um microambiente favorável à sua manutenção e também a transformação de outras células. O microambiente da lesão possui características pró-oxidativas (aumento de carbonil e FOX) e também citocinas que contribuem para a manutenção da senescência (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10 e IL-15). Esse ambiente além de proporcionar um estado basal constante de inflamação e estresse pode induzir as células a entrarem em senescência mantendo assim um *feedback* positivo de aumento de estresse oxidativo levando à transformação de mais células senescentes. Não podemos deixar de ressaltar que, o endométrio eutópico poderia favorecer a manutenção do crescimento das lesões e também facilitar o processo de senescência celular nas lesões, através de um refluxo menstrual mais inflamatório. Por isso acreditamos que a teoria da menstruação retrógrada somada a alterações imunológicas seja o principal responsável pelo surgimento e desenvolvimento da endometriose.

É importante salientar algumas fragilidades do trabalho que devem ser levadas em consideração durante a interpretação dos resultados. Incluímos em nosso estudo pacientes com alterações uterinas como mioma. Apesar de termos excluído do estudo miomas submucosos, que poderiam alterar o comportamento das células endometriais, não podemos excluir a possibilidade de outros tipos de mioma, como o subseroso e intramural, de alterarem o comportamento de alguns marcadores, como citocinas inflamatórias, especialmente nas dosagens do fluido peritoneal. Além disso, baseamos a divisão das fases do ciclo (proliferativa e secretora) na data da última menstruação informada pela paciente. Sabemos das limitações que isso implica, principalmente quando consideramos as diferenças entre as variações do ciclo menstrual entre as mulheres, porém mantivemos a paciente como seu próprio controle (lesão X endométrio eutópico) como forma de controlar a influência da fase sobre as análises. Devemos ressaltar também, que por se tratar de um estudo transversal, os resultados obtidos representam uma imagem do que poderia estar ocorrendo nos tecidos avaliados, sendo outras análises necessárias para confirmar a senescência celular.

A endometriose é um distúrbio caracterizado por inflamação crônica, característica também presente em células senescentes. Embora a inflamação possa ajudar na regeneração tecidual e no recrutamento de células imunes, a presença contínua de inflamação pode ser mais perigosa do que benéfica por promover angiogênese, dano ao DNA e estresse oxidativo. Ao compreender o fenótipo secretor

nos tecidos da endometriose, tornou-se evidente que as lesões endometrióticas profundas possuem mecanismos intrínsecos de controle. Tais mecanismos podem favorecer a formação de microambientes distintos e a manutenção da doença. Considerando as evidências que nos ajudam a confirmar a nossa hipótese, acreditamos que a endometriose tem por característica o acúmulo de células senescentes, tanto na lesão quanto no endométrio eutópico. A presença de marcadores de senescência em lesões em ambos os tipos celulares (glandular e não glandular), como no endométrio eutópico, pode ajudar a avaliar se as características de senescência estão presentes na endometriose e se essa característica favoreceria a manutenção da endometriose. Além disso, compreender o processo de senescência na endometriose poderá auxiliar no desenvolvimento de novas terapias. Sabemos que o acúmulo de células senescentes prejudica a homeostase do tecido, alterando função celular e auxiliando na manutenção de diversas doenças crônicas.⁽¹⁴⁸⁾ Foi demonstrado que remoção de células senescentes pode aliviar os sintomas de doenças relacionadas crônicas à idade^(212,213) e é dessa maneira que gostaríamos de colaborar com nossa pesquisa, no progresso do entendimento da endometriose em busca sempre de melhorar a qualidade de vida das mulheres. Moléculas anti-envelhecimento como resveratrol, rapamicina, metformina e aspirina podem ser investigadas como potenciais terapêuticas para direcionar as vias de senescência e aliviar os sintomas. Mais estudos são necessários para confirmar o acúmulo de células de senescência na endometriose endometriótica profunda.

6 CONCLUSÕES

1. Encontramos maior concentração de marcadores de senescência (p16^{Ink4a}, Lamin b1 e IL-1 β) na lesão, em relação ao endométrio eutópico;
2. Não encontramos diferenças entre os marcadores de senescência, quando comparamos o endométrio eutópico com o controle;
3. Encontramos um ambiente mais oxidativo nas lesões com aumento de oxidação proteica e lipídica (carbonil e FOX), comparado ao endométrio eutópico. Assim como encontramos um ambiente mais oxidativo com diminuição de antioxidantes (GSH e GSSG) no endométrio eutópico comparado ao controle;
4. Encontramos características distintas entre a concentração de diversas citocinas, tanto nos tecidos, quanto no fluido peritoneal, quando comparadas lesão com endométrio eutópico, assim como quando comparamos o endométrio eutópico com o controle;
5. Observamos um aumento de proteínas fosforiladas (ERK, JNK, p38, STAT1) pertencentes a via MAPK nas lesões de endometriose em comparação com o endométrio eutópico.

7 REFERÊNCIAS

1. Vassiliadis S, Athanassakis I. Recent knowledge and new pharmaceutical products in potential alleviation of endometriosis. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2008;2(2):128–38.
2. Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1997;24(2):235–58.
3. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*; 2004;364(9447):1789–99.
4. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L, Harada T. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(5):261–75.
5. Piccinato CA, Malvezzi H, Gibson DA, Saunders PT. Sulfation pathways: contribution of intracrine oestrogens to the aetiology of endometriosis. *J Mol Endocrinol*. 2018;61(2):T253–70.
6. Jiang L, Yan Y, Liu Z, Wang Y. Inflammation and endometriosis. *Front Biosci*. 2016;21(5):941–8.
7. Mettler L, Ruprai R, Alkatout I. Impact of medical and surgical treatment of endometriosis on the cure of endometriosis and pain. *BioMed Res Int*. 2014;2014:264653.
8. Sourial S, Tempest N, Hapangama DK. Theories on the pathogenesis of endometriosis. *Int J Reprod Med*. 2014;2014:179515.
9. Gordts S, Koninckx P, Brosens I. Pathogenesis of deep endometriosis. *Fertil Steril*. 2017;108(6):872–885.e1.
10. Koninckx PR, Ussia A, Adamyan L, Wattiez A, Gomel V, Martin DC. Pathogenesis of endometriosis: the genetic/epigenetic theory. *Fertil Steril*. 2019;111(2):327–40.
11. Abrao MS, Neme RM, Carvalho FM, Aldrighi JM, Pinotti JA. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. *Int J Gynaecol Obstet*. 2003;82(1):31–40.
12. Johnson NP, Hummelshoj L, Adamson GD, Keckstein J, Taylor HS, Abrao MS, et al.; World Endometriosis Society Sao Paulo Consortium. World Endometriosis Society consensus on the classification of endometriosis. *Hum Reprod*. 2017;32(2):315–24.
13. American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997;67(5):817–21.
14. Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum: a different histopathogenesis? *Gynaecol Endosc*. 1997;6(4):203–9.
15. Gueuvoghlian-Silva BY, Bellelis P, Barbeiro DF, Hernandez C, Podgaec S. Treg and NK cells related cytokines are associated with deep rectosigmoid endometriosis and clinical symptoms related to the disease. *J Reprod Immunol*. 2018;126:32–8.
16. Tsai HW, Huang MT, Wang PH, Huang BS, Chen YJ, Hsieh SL. Decoy receptor 3 promotes cell adhesion and enhances endometriosis development. *J Pathol*. 2018;244(2):189–202.

17. Viganò P, Gaffuri B, Somigliana E, Busacca M, Di Blasio AM, Vignali M. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 mRNA and protein is enhanced in endometriosis versus endometrial stromal cells in culture. *Mol Hum Reprod*. 1998;4(12):1150–6.
18. Laschke MW, Menger MD. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2007;13(4):331–42.
19. Hey-Cunningham AJ, Peters KM, Zevallos HB, Berbic M, Markham R, Fraser IS. Angiogenesis, lymphangiogenesis and neurogenesis in endometriosis. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013;5(3):1033–56.
20. Santanam N, Murphy AA, Parthasarathy S. Macrophages, oxidation, and endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;955:183–98.
21. Fung JN, Rogers PA, Montgomery GW. Identifying the biological basis of GWAS hits for endometriosis. *Biol Reprod*. 2015;92(4):87.
22. Rižner TL. Estrogen metabolism and action in endometriosis. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;307(1-2):8–18.
23. Laux-Biehlmann A, d'Hooghe T, Zollner TM. Menstruation pulls the trigger for inflammation and pain in endometriosis. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(5):270–6.
24. Malvezzi H, Viana BG, Dobo C, Filippi RZ, Podgaec S, Piccinato CA. Depleted lamin B1: a possible marker of the involvement of senescence in endometriosis? *Arch Gynecol Obstet*. 2018;297(4):977–84.
25. Hernandez C, Silveira P, Rodrigues Sereia AF, Christoff AP, Mendes H, Oliveira LF, et al. Microbiome profile of deep endometriosis patients: comparison of vaginal fluid, endometrium and lesion. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(3):163.
26. Malvezzi H, Hernandez C, Piccinato CA, Podgaec S. Interleukin in endometriosis-associated infertility-pelvic pain: systematic review and meta-analysis. *Reproduction*. 2019;158(1):1–12.
27. Gupta S, Agarwal A, Krajcir N, Alvarez JG. Role of oxidative stress in endometriosis. *Reprod Biomed Online*. 2006;13(1):126–34.
28. Santulli P, Chouzenoux S, Fiorese M, Marcellin L, Lemarechal H, Millischer AE, et al. Protein oxidative stress markers in peritoneal fluids of women with deep infiltrating endometriosis are increased. *Hum Reprod*. 2015;30(1):49–60.
29. Singh AK, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. *Reprod Toxicol*. 2013;42:116–24.
30. Nasiri N, Moini A, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Salman-Yazdi R, Arabipoor A. Oxidative stress statues in serum and follicular fluid of women with endometriosis. *Cell J*. 2017;18(4):582-7.
31. Coutinho LM, Ferreira MC, Rocha ALL, Carneiro MM, Reis FM. New biomarkers in endometriosis. *Adv Clin Chem*. 2019;89:59-77.
32. Malvezzi H, Da Broi MG, Meola J, Rosa-E-Silva JC, Ferriani RA, Navarro PA. Peritoneal fluid of women with endometriosis reduces SOD1 in bovine oocytes in vitro maturation. *Cell Tissue Res*. 2018;372(3):621–8.

33. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(7):482-96.
34. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(9):729-40.
35. Zondervan KT, Cardon LR, Kennedy SH. What makes a good case-control study? Design issues for complex traits such as endometriosis. *Hum Reprod.* 2002;17(6):1415-23.
36. Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S, Borini A. Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2010;27(8):441-7.
37. Parazzini F, Esposito G, Tozzi L, Noli S, Bianchi S. Epidemiology of endometriosis and its comorbidities. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017;209:3-7.
38. Weir E, Mustard C, Cohen M, Kung R. Endometriosis: what is the risk of hospital admission, readmission, and major surgical intervention? *J Minim Invasive Gynecol.* 2005;12(6):486-93.
39. Fuldeore M, Yang H, Du EX, Soliman AM, Wu EQ, Winkel C. Healthcare utilization and costs in women diagnosed with endometriosis before and after diagnosis: a longitudinal analysis of claims databases. *Fertil Steril.* 2015;103(1):163-71.
40. Shafrir AL, Farland LV, Shah DK, Harris HR, Kvaskoff M, Zondervan K, et al. Risk for and consequences of endometriosis: A critical epidemiologic review. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;51:1-15.
41. Sarria-Santamera A, Orazumbekova B, Terzic M, Issanov A, Chaowen C, Asúnsolo-Del-Barco A. Systematic review and meta-analysis of incidence and prevalence of endometriosis. *Healthcare (Basel).* 2020;9(1):1-16.
42. Morassutto C, Monasta L, Ricci G, Barbone F, Ronfani L. Incidence and estimated prevalence of endometriosis and adenomyosis in Northeast Italy: a data linkage study. *PLoS One.* 2016;11(4):e0154227.
43. Eisenberg VH, Weil C, Chodick G, Shalev V. Epidemiology of endometriosis: a large population-based database study from a healthcare provider with 2 million members. *BJOG.* 2018;125(1):55-62.
44. Gylfason JT, Kristjansson KA, Sverrisdottir G, Jonsdottir K, Rafnsson V, Geirsson RT. Pelvic endometriosis diagnosed in an entire nation over 20 years. *Am J Epidemiol.* 2010;172(3):237-43.
45. Zondervan KT, Phil D, Becker CM, Missmer SA. Endometriosis, review article. *N Engl J Med.* 2020;382(1244):56.
46. Simoens S, Dunselman G, Dirksen C, Hummelshoj L, Bokor A, Brandes I, et al. The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Hum Reprod.* 2012;27(5):1292-9.
47. Levy AR, Osenenko KM, Lozano-Ortega G, Sambrook R, Jeddi M, Bélisle S, et al. Economic burden of surgically confirmed endometriosis in Canada. *J Obstet Gynaecol Can.* 2011;33(8):830-7.
48. De Graaff AA, D'Hooghe TM, Dunselman GA, Dirksen CD, Hummelshoj L, Simoens S, et al.; WERF EndoCost Consortium. The significant effect of endometriosis on physical, mental and social wellbeing: results from an international cross-sectional survey. *Hum Reprod.*

2013;28(10):2677–85.

49. Donatti L, Malvezzi H, De Azevedo BC, Podgaec S. Cognitive behavioral therapy in endometriosis, psychological based intervention: a systematic review. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2022. [Aprovado para publicação].

50. Bellelis P, Podgaec S, Abrão MS. Fatores ambientais e endometriose: um ponto de vista. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2014;36(10):433–5.

51. Signorile PG, Baldi A. Endometriosis: new concepts in the pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(6):778–80.

52. Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, d'Hooghe T, de Cicco Nardone F, de Cicco Nardone C, et al.; World Endometriosis Research Foundation Global Study of Women's Health consortium. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil Steril*. 2011;96(2):366–373.e8.

53. Culley L, Law C, Hudson N, Denny E, Mitchell H, Baumgarten M, et al. The social and psychological impact of endometriosis on women's lives: a critical narrative review. *Hum Reprod Update*. 2013;19(6):625–39.

54. Zubrzycka A, Zubrzycki M, Janecka A, Zubrzycka M. New horizons in the etiopathogenesis and non-invasive diagnosis of endometriosis. *Curr Mol Med*. 2015;15(8):697–713.

55. Da Broi MG, Malvezzi H, Paz CC, Ferriani RA, Navarro PA. Follicular fluid from infertile women with mild endometriosis may compromise the meiotic spindles of bovine metaphase II oocytes. *Hum Reprod*. 2014;29(2):315–23.

56. Da Broi MG, Navarro PA. Oxidative stress and oocyte quality: etiopathogenic mechanisms of minimal/mild endometriosis-related infertility. *Cell Tissue Res*. 2016;364(1):1–7.

57. Zullo F, Spagnolo E, Saccone G, Acunzo M, Xodo S, Ceccaroni M, et al. Endometriosis and obstetrics complications: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2017;108(4):667–672.e5.

58. Annicchino G, Malvezzi H, Piccinato CA, Podgaec S. Is there an increased risk for unfavorable obstetric outcomes in women with endometriosis? An evaluation of evidences. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2020;42(4):200–10.

59. Kyama CM, Debrock S, Mwenda JM, D'Hooghe TM. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:123.

60. Carvalho LF, Rossener R, Azeem A, Malvezzi H, Abrão MS, Agarwal A. From conception to birth - how endometriosis affects the development of each stage of reproductive life. *Minerva Ginecol*. 2013;65(2):181–98.

61. Fonseca MF, Aragao LC, Sessa FV, Resende JA Jr, Crispi CP. Interrelationships among endometriosis-related pain symptoms and their effects on health-related quality of life: a sectional observational study. *Obstet Gynecol Sci*. 2018;61(5):605–14.

62. Dunselman GA, Vermeulen N, Becker C, Calhaz-Jorge C, D'Hooghe T, De Bie B, et al.; European Society of Human Reproduction and Embryology. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2014;29(3):400–12.

63. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril*. 2012;98(3):511–9.

64. Sampson JA. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am J Pathol.* 1927;3(2):93.
65. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol.* 1984;64(2):151–4.
66. Ahn SH, Monsanto SP, Miller C, Singh SS, Thomas R, Tayade C. Pathophysiology and immune dysfunction in endometriosis. *Biomed Res Int.* 2015;2015:795976.
67. Pupo-Nogueira A, de Oliveira RM, Petta CA, Podgaec S, Dias JA Jr, Abrao MS. Vascular endothelial growth factor concentrations in the serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2007;99(1):33–7.
68. D'Amora P, Maciel TT, Tambellini R, Mori MA, Pesquero JB, Sato H, et al. Disrupted cell cycle control in cultured endometrial cells from patients with endometriosis harboring the progesterone receptor polymorphism PROGINS. *Am J Pathol.* 2009;175(1):215–24.
69. Béliard A, Noël A, Foidart JM. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril.* 2004;82(1):80–5.
70. Bulun SE, Monsivais D, Kakinuma T, Furukawa Y, Bernardi L, Pavone ME, et al. Molecular biology of endometriosis: from aromatase to genomic abnormalities. *Semin Reprod Med.* 2015;33(3):220–4.
71. Scutiero G, Iannone P, Bernardi G, Bonaccorsi G, Spadaro S, Volta CA, Greco P, Nappi L. Oxidative stress and endometriosis: a systematic review of the literature. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:7265238.
72. Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J, Goldman MB. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Hum Reprod Update.* 2008;14(4):345–57.
73. Donnez J, Binda MM, Donnez O, Dolmans MM. Oxidative stress in the pelvic cavity and its role in the pathogenesis of endometriosis. *Fertil Steril.* 2016;106(5):1011–7.
74. Wu G, Bersinger NA, Mueller MD, von Wolff M. Intrafollicular inflammatory cytokines but not steroid hormone concentrations are increased in naturally matured follicles of women with proven endometriosis. *J Assist Reprod Genet.* 2017;34(3):357–64.
75. Mu F, Harris HR, Rich-Edwards JW, Hankinson SE, Rimm EB, Spiegelman D, et al. A prospective study of inflammatory markers and risk of endometriosis. *Am J Epidemiol.* 2018;187(3):515–22.
76. García Manero M, Olartecoechea B, Aubá M, Alcázar JL, López G. [Angiogenesis and endometriosis]. *Rev Med Univ Navarra.* 2009;53(2):8–13. Spanish.
77. Vinatier D, Cosson M, Dufour P. Is endometriosis an endometrial disease? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;91(2):113–25.
78. Klemmt PA, Carver JG, Koninckx P, McVeigh EJ, Mardon HJ. Endometrial cells from women with endometriosis have increased adhesion and proliferative capacity in response to extracellular matrix components: towards a mechanistic model for endometriosis progression. *Hum Reprod.* 2007;22(12):3139–47.
79. Shao J, Zhang B, Yu JJ, Wei CY, Zhou WJ, Chang KK, et al. Macrophages promote the growth and invasion of endometrial stromal cells by downregulating IL-24 in endometriosis. *Reproduction.* 2016;152(6):673–82.

80. Thiruchelvam U, Wingfield M, O'Farrelly C. Natural killer cells: key players in endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2015;74(4):291–301.
81. Lin YJ, Lai MD, Lei HY, Wing LY. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology*. 2006;147(3):1278–86.
82. Moens U, Kostenko S, Sveinbjørnsson B. The role of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinases (MAPKAPKs) in inflammation. *Genes (Basel)*. 2013;4(2):101–33.
83. Nisenblatt V, Bossuyt PM, Shaikh R, Farquhar C, Jordan V, Scheffers CS, et al. Blood biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;2016(5):CD012179.
84. Mansour G, Sharma RK, Agarwal A, Falcone T. Endometriosis-induced alterations in mouse metaphase II oocyte microtubules and chromosomal alignment: a possible cause of infertility. *Fertil Steril*. 2010;94(5):1894–9.
85. Mansour G, Aziz N, Sharma R, Falcone T, Goldberg J, Agarwal A. The impact of peritoneal fluid from healthy women and from women with endometriosis on sperm DNA and its relationship to the sperm deformity index. *Fertil Steril*. 2009;92(1):61–7.
86. Oner-Iyidoğan Y, Koçak H, Gürdöl F, Korkmaz D, Buyru F. Indices of oxidative stress in eutopic and ectopic endometria of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*. 2004;57(4):214–7.
87. Defrère S, Van Langendonckt A, Vaesen S, Jouret M, González Ramos R, Gonzalez D, et al. Iron overload enhances epithelial cell proliferation in endometriotic lesions induced in a murine model. *Hum Reprod*. 2006;21(11):2810–6.
88. Szczepańska M, Koźlik J, Skrzypczak J, Mikołajczyk M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril*. 2003;79(6):1288–93.
89. Polak G, Wertel I, Barczyński B, Kwaśniewski W, Bednarek W, Kotarski J. Increased levels of oxidative stress markers in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;168(2):187–90.
90. Gupta S, Ghulmiyyah J, Sharma R, Halabi J, Agarwal A. Power of proteomics in linking oxidative stress and female infertility. *Biomed Res Int*. 2014;2014:916212.
91. Van Langendonckt A, Casanas-Roux F, Dolmans MM, Donnez J. Potential involvement of hemoglobin and heme in the pathogenesis of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril*. 2002;77(3):561–70.
92. Rižner TL. Diagnostic potential of peritoneal fluid biomarkers of endometriosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(4):557–80.
93. Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Hirata T, Harada M, et al. Possible pathophysiological roles of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2004;52(5):306–11.
94. Ngô C, Chéreau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am J Pathol*. 2009;175(1):225–34.
95. McKinnon BD, Kocbek V, Nirgianakis K, Bersinger NA, Mueller MD. Kinase signalling pathways in endometriosis: potential targets for non-hormonal therapeutics. *Hum Reprod Update*. 2016;22(3):382–403.

96. Yotova IY, Quan P, Leditznig N, Beer U, Wenzl R, Tschugguel W. Abnormal activation of Ras/Raf/MAPK and RhoA/ROCKII signalling pathways in eutopic endometrial stromal cells of patients with endometriosis. *Hum Reprod.* 2011;26(4):885–97.
97. Bora G, Yaba A. The role of mitogen-activated protein kinase signaling pathway in endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res.* 2021;47(5):1610–23.
98. Matsuzaki S, Darcha C. Co-operation between the AKT and ERK signaling pathways may support growth of deep endometriosis in a fibrotic microenvironment in vitro. *Hum Reprod.* 2015;30(7):1606–16.
99. Cakmak H, Seval-Celik Y, Arlier S, Guzeloglu-Kayisli O, Schatz F, Arici A, et al. p38 mitogen-activated protein kinase is involved in the pathogenesis of endometriosis by modulating inflammation, but not cell survival. *Reprod Sci.* 2018;25(4):587–97.
100. Mei J, Li MQ, Ding D, Li DJ, Jin LP, Hu WG, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO1) enhances survival and invasiveness of endometrial stromal cells via the activation of JNK signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(3):431–44.
101. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med.* 2015;21(12):1424–35.
102. Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol.* 2007;371(1):21–31.
103. Saretzki G. Cellular senescence in the development and treatment of cancer. *Curr Pharm Des.* 2010;16(1):79–100.
104. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010;5(1):99–118.
105. Velarde MC, Demaria M, Campisi J. Cancer and Aging. *Interdiscip Top Gerontol.* 2013;38:17–27.
106. Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell.* 2004;14(4):501–13.
107. Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(6):816–27.
108. Ohtani N, Hara E. Roles and mechanisms of cellular senescence in regulation of tissue homeostasis. *Cancer Sci.* 2013;104(5):525–30.
109. Burton DG, Krizhanovsky V. Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(22):4373–86.
110. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(20):9363–7.
111. Lasry A, Ben-Neriah Y. Senescence-associated inflammatory responses: aging and cancer perspectives. *Trends Immunol.* 2015;36(4):217–28.
112. Bernadotte A, Mikhelson VM, Spivak IM. Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging (Albany NY).* 2016;8(1):3–11.

113. Singh AK, Dutta M, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Intrafollicular interleukin-8, interleukin-12, and adrenomedullin are the promising prognostic markers of oocyte and embryo quality in women with endometriosis. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(10):1363–72.
114. Dutta EH, Behnia F, Boldogh I, Saade GR, Taylor BD, Kacerovský M, et al. Oxidative stress damage-associated molecular signaling pathways differentiate spontaneous preterm birth and preterm premature rupture of the membranes. *Mol Hum Reprod.* 2016;22(2):143–57.
115. Fatima Z, Guo P, Huang D, Lu Q, Wu Q, Dai M, et al. The critical role of p16/Rb pathway in the inhibition of GH3 cell cycle induced by T-2 toxin. *Toxicology.* 2018;400-401:28–39.
116. Zhang CY, Bao W, Wang LH. Downregulation of p16(ink4a) inhibits cell proliferation and induces G1 cell cycle arrest in cervical cancer cells. *Int J Mol Med.* 2014;33(6):1577–85.
117. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010;24(22):2463–79.
118. Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter-Kochanek K, Jansen-Dürr P, et al. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell.* 2006;5(5):379–89.
119. Shimi T, Pflieghaar K, Kojima S, Pack CG, Solovei I, Goldman AE, et al. The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes Dev.* 2008;22(24):3409–21.
120. Solovei I, Wang AS, Thanisch K, Schmidt CS, Krebs S, Zwerger M, et al. LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell.* 2013;152(3):584–98.
121. Scaffidi P, Misteli T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med.* 2005;11(4):440–5.
122. Dreesen O, Ong PF, Chojnowski A, Colman A. The contrasting roles of lamin B1 in cellular aging and human disease. *Nucleus.* 2013;4(4):283–90.
123. Dreesen O, Chojnowski A, Ong PF, Zhao TY, Common JE, Lunny D, et al. Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence. *J Cell Biol.* 2013;200(5):605–17.
124. Freund A, Laberge RM, Demaria M, Campisi J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell.* 2012;23(11):2066–75.
125. González-Puertos VY, Maciel-Barón LA, Barajas-Gómez BA, López-Diazguerrero NE, Diazguerrero M. Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) involvement in the development of cancer, aging and age related diseases. *Gac Med Mex.* 2015;151:460–8.
126. Lau L, Porciuncula A, Yu A, Iwakura Y, David G. Uncoupling the Senescence-Associated Secretory Phenotype from Cell Cycle Exit via Interleukin-1 Inactivation Unveils Its Protumorigenic Role. *Mol Cell Biol.* 2019;39(12):1–17.
127. Wiggins KA, Parry AJ, Cassidy LD, Humphry M, Webster SJ, Goodall JC, et al. IL-1 α cleavage by inflammatory caspases of the noncanonical inflammasome controls the senescence-associated secretory phenotype. *Aging Cell.* 2019;18(3):e12946.
128. Orjalo AV, Bhaumik D, Gengler BK, Scott GK, Campisi J. Cell surface-bound IL-1 α is an

upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(40):17031–6.

129. Uekawa N, Nishikimi A, Isobe K, Iwakura Y, Maruyama M. Involvement of IL-1 family proteins in p38 linked cellular senescence of mouse embryonic fibroblasts. *FEBS Lett*. 2004;575(1-3):30–4.

130. DeHeer HL, Parry BW, Grindem CB. Peritoneal fluid. In: Cowell RL, Tyler RD, editors. *Diagnostic cytology and hematology of the horse*. 2nd ed. Saint Louis: Mosby; 2002. p. 127-62.

131. Berumen Enciso F, Pavía Crespo L, Castillo Acuña J. [Classification and nomenclature of menstrual alterations]. *Ginecol Obstet Mex*. 2007;75(10):641–51. Spanish.

132. Galli F, Piroddi M, Annetti C, Aisa C, Floridi E, Floridi A. Oxidative stress and reactive oxygen species. *Contrib Nephrol*. 2005;149:240-60.

133. Da Costa CM, Dos Santos RC, Lima ES. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(5):345–50.

134. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol*. 1994;233(C):380–5.

135. Erdelmeier I, Gérard-Monnier D, Yadan JC, Chaudière J, Yadan JC, Chaudière J. Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol*. 1998;11(10):1184–94.

136. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186:464-78.

137. Morettin PA, Bussab W O. *Estatística básica*. 6a ed. São Paulo: Saraiva; 2010.

138. Faraway JJ. *Extending the linear model with R: generalized linear, mixed effects and nonparametric regression models*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2016.

139. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(2):75–95.

140. Salvestrini V, Sell C, Lorenzini A. Obesity may accelerate the aging process. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:266.

141. Souza RB, Andrade DR. Oxygen free radicals and pulmonary disease. *J Bras Pneumol*. 2005;31(1):60–8.

142. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990;186(C):407–21.

143. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003;329(1-2):23-38.

144. Huber PC, Almeida WP, Fátima A. [Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes]. *Quim Nova*. 2008;31(5):1170–9. Portuguese.

145. Rover Júnior LR, Höehr NF, Vellasco AP, Kubota LT. [Antioxidant system involving the glutathione metabolic cycle associated to electroanalytical methods in the oxidative stress evaluation]. *Quim Nova*. 2001;24(1):112–9. Portuguese.

146. Kumari R, Jat P. Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:645593.
147. Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of cellular senescence. *Trends Cell Biol.* 2018;28(6):436-53.
148. Tuttle CSL, Luesken SW, Waaijer ME, Maier AB. Senescence in tissue samples of humans with age-related diseases: a systematic review. *Ageing Res Rev.* 2021;68:101334.
149. Liu JY, Souroullas GP, Diekman BO, Krishnamurthy J, Hall BM, Sorrentino JA, et al. Cells exhibiting strong p16 INK4a promoter activation in vivo display features of senescence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116(7):2603–11.
150. Tabibzadeh S. Signaling pathways and effectors of aging. *Front Biosci.* 2021;26(1):50–96.
151. Ashapkin VV, Kutueva LI, Kurchashova SY, Kireev II. Are there common mechanisms between the Hutchinson-Gilford progeria syndrome and natural aging? *Front Genet.* 2019;10:455.
152. Cindrova-Davies T, Fogarty NM, Jones CJ, Kingdom J, Burton GJ. Evidence of oxidative stress-induced senescence in mature, post-mature and pathological human placentas. *Placenta.* 2018;68:15–22.
153. Shang D, Hong Y, Xie W, Tu Z, Xu J. Interleukin-1 β drives cellular senescence of rat astrocytes induced by oligomerized amyloid β peptide and oxidative stress. *Front Neurol.* 2020;11:1–12.
154. En A, Takauji Y, Ayusawa D, Fujii M. The role of lamin B receptor in the regulation of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Exp Cell Res.* 2020;390(1):111927.
155. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular senescence: defining a path forward. *Cell.* 2019;179(4):813–27.
156. Yoon N, Yoon G, Park CK, Kim HS. Stromal p16 expression is significantly increased in malignant ovarian neoplasms. *Oncotarget.* 2016;7(40):64665–73.
157. Delbandi AA, Mahmoudi M, Shervin A, Heidari S, Kolahehdouz-Mohammadi R, Zarnani AH. Evaluation of apoptosis and angiogenesis in ectopic and eutopic stromal cells of patients with endometriosis compared to non-endometriotic controls. *BMC Womens Health.* 2020;20(1):3.
158. Luckow Invitti A, Schor E, Martins Parreira R, Kopelman A, Kamergorodsky G, Gonçalves GA, et al. Inflammatory cytokine profile of co cultivated primary cells from the endometrium of women with and without endometriosis. *Mol Med Rep.* 2018;18(2):1287–96.
159. Cacciottola L, Donnez J, Dolmans MM. Can endometriosis-related oxidative stress pave the way for new treatment targets? *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):7138.
160. Arai R, En A, Takauji Y, Maki K, Miki K, Fujii M, et al. Lamin B receptor (LBR) is involved in the induction of cellular senescence in human cells. *Mech Ageing Dev.* 2019;178:25–32.
161. Lukášová E, Kovarčík A, Bacířková A, Falk M, Kozubek S. Loss of lamin B receptor is necessary to induce cellular senescence. *Biochem J.* 2017;474(2):281–300.
162. Wang AS, Ong PF, Chojnowski A, Clavel C, Dreesen O. Loss of lamin B1 is a biomarker to quantify cellular senescence in photoaged skin. *Sci Rep.* 2017;7(1):15678.

163. Lukášová E, Kovařík A, Kozubek S. Consequences of Lamin B1 and Lamin B receptor downregulation in senescence. *Cells*. 2018;7(2):11.
164. Meyer P, Maity P, Burkovski A, Schwab J, Müssel C, Singh K, et al. A model of the onset of the senescence associated secretory phenotype after DNA damage induced senescence. *PLoS Comput Biol*. 2017;13(12):e1005741.
165. Philipot D, Guérit D, Platano D, Chuchana P, Olivotto E, Espinoza F, et al. p16INK4a and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):R58.
166. Dembic Z. Cytokines of the immune system: interleukins. In: Dembic Z, editor. *The cytokines of the immune system*. Amsterdam: Academic Press; 2015. p. 143-239.
167. Volpato LK, Horewicz VV, Bobinski F, Martins DF, Piovezan AP. Annexin A1, FPR2/ALX, and inflammatory cytokine expression in peritoneal endometriosis. *J Reprod Immunol*. 2018;129:30–5.
168. Sikora J, Mielczarek-palacz A, Kondera-anasz Z. Association of the precursor of Interleukin-1 β and peritoneal inflammation — role in pathogenesis of endometriosis. *J Clin Lab Anal*. 2015;2016(30):831–7.
169. Ren K, Torres R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Res Brain Res Rev*. 2009;60(1):57–64.
170. Montoya-Estrada A, Coria-García CF, Cruz-Orozco OP, Aguayo-González P, Torres-Ramos YD, Flores-Herrera H, et al. Increased systemic and peritoneal oxidative stress biomarkers in endometriosis are not related to retrograde menstruation. *Redox Rep*. 2019;24(1):51–5.
171. Da Broi MG, De Albuquerque FO, De Andrade AZ, Jordão Junior AA, Navarro PA. [Systemic and follicular oxidative stress in infertile women with endometriosis undergoing intracytoplasmic sperm injection]. *Reprod Clim*. 2014;29(3):112–22. Portuguese.
172. Verit FF, Erel O, Celik N. Serum paraoxonase-1 activity in women with endometriosis and its relationship with the stage of the disease. *Hum Reprod*. 2008;23(1):100–4.
173. Andrade AZ, Rodrigues JK, Dib LA, Romão GS, Ferriani RA, Jordão Junior AA, et al. [Serum markers of oxidative stress in infertile women with endometriosis]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2010;32(6):279–85. Portuguese.
174. Mafra D, Abdalla DS, Cozzolino SM. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. *Rev Nutr*. 1999;12(3):205–12.
175. García-Gil FA, Albendea CD, López-Pingarrón L, Royo-Dachary P, Martínez-Guillén J, Piedrafita E, et al. Altered cellular membrane fluidity levels and lipid peroxidation during experimental pancreas transplantation. *J Bioenerg Biomembr*. 2012;44(5):571–7.
176. Tekpli X, Holme JA, Sergeant O, Lagadic-Gossmann D. Role for membrane remodeling in cell death: implication for health and disease. *Toxicology*. 2013;304:141–57.
177. García JJ, Piñol-Ripoll G, Martínez-Ballarín E, Fuentes-Broto L, Miana-Mena FJ, Venegas C, et al. Melatonin reduces membrane rigidity and oxidative damage in the brain of SAMP8 mice. *Neurobiol Aging*. 2011;32(11):2045–54.
178. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement,

and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1-2):1–12.

179. Ekarattanawong S, Tanprasertkul C, Somprasit C, Chamod P, Tiengtip R, Bhamarapratana K, et al. Possibility of using superoxide dismutase and glutathione peroxidase as endometriosis biomarkers. *Int J Womens Health.* 2017;9:711–6.

180. Ferreira AL, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Bras Med.* 1997;43(1):61–8.

181. Giustarini D, Colombo G, Garavaglia ML, Astori E, Portinaro NM, Reggiani F, et al. Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. *Free Radic Biol Med.* 2017;112:360–75.

182. Pallardó FV, Markovic J, García JL, Viña J. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1-2):77–85.

183. Haendeler J, Hoffmann J, Diehl JF, Vasa M, Spyridopoulos I, Zeiher AM, et al. Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. *Circ Res.* 2004;94(6):768–75.

184. Paul WE. What determines Th2 differentiation, in vitro and in vivo? *Immunol Cell Biol.* 2010;88(3):236–9.

185. Cho YJ, Lee SH, Park JW, Han M, Park MJ, Han SJ. Dysfunctional signaling underlying endometriosis: current state of knowledge. *J Mol Endocrinol.* 2018;60(3):R97–113.

186. Podgaec S, Abrao MS, Dias JA Jr, Rizzo LV, de Oliveira RM, Baracat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod.* 2007;22(5):1373–9.

187. Quattrone F, Sanchez AM, Pannese M, Hemmerle T, Viganò P, Candiani M, et al. The targeted delivery of interleukin 4 inhibits development of endometriotic lesions in a mouse model. *Reprod Sci.* 2015;22(9):1143–52.

188. OuYang Z, Hirota Y, Osuga Y, Hamasaki K, Hasegawa A, Tajima T, et al. Interleukin-4 stimulates proliferation of endometriotic stromal cells. *Am J Pathol.* 2008;173(2):463–9.

189. Olkowska-Truchanowicz J, Białoszewska A, Zwierzchowska A, Sztokfisz-Ignasiak A, Janiuk I, Dąbrowski F, et al. Peritoneal fluid from patients with ovarian endometriosis displays immunosuppressive potential and stimulates th2 response. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15):8134.

190. Knific T, Fishman D, Vogler A, Gstöttner M, Wenzl R, Peterson H, et al. Multiplex analysis of 40 cytokines do not allow separation between endometriosis patients and controls. *Sci Rep.* 2019;9(1):16738.

191. Huang J, Li Z, Yao X, Li Y, Reng X, Li J, et al. Altered Th1/Th2 commitment contributes to lung senescence in CXCR3-deficient mice. *Exp Gerontol.* 2013;48(8):717–26.

192. Manero MG, Alcazar JL. Interleukin-8 serum levels do not correlate with pelvic pain in patients with ovarian endometriomas. *Fertil Steril.* 2010;94(2):450–2.

193. Podgaec S, Rizzo LV, Fernandes LF, Baracat EC, Abrao MS. CD4(+) CD25(high) Foxp3(+) cells increased in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2012;68(4):301–8.

194. Velasco I, Acién P, Campos A, Acién MI, Ruiz-Maciá E. Interleukin-6 and other soluble

factors in peritoneal fluid and endometriomas and their relation to pain and aromatase expression. *J Reprod Immunol.* 2010;84(2):199–205.

195. Radović Janošević D, Trandafilović M, Krtinić D, Čolović H, Milošević Stevanović J, Pop-Trajković Dinić S. Endometrial immunocompetent cells in proliferative and secretory phase of normal menstrual cycle. *Folia Morphol (Warsz).* 2020;79(2):296–302.

196. Perera PY, Lichy JH, Waldmann TA, Perera LP. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes Infect.* 2012;14(3):247–61.

197. Han L, Zhang Y, Zhang M, Guo L, Wang J, Zeng F, et al. Interleukin-1 β -Induced senescence promotes osteoblastic transition of vascular smooth muscle cells. *Kidney Blood Press Res.* 2020;45(2):314–30.

198. Lin TC, Wang KH, Chuang KH, Kao AP, Kuo TC. Interleukin-33 promotes invasiveness of human ovarian endometriotic stromal cells through the ST2/MAPK/MMP-9 pathway activated by 17 β -estradiol. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2021;60(4):658–64.

199. Uimari O, Rahmioglu N, Nyholt DR, Vincent K, Missmer SA, Becker C, et al. Genome-wide genetic analyses highlight mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod.* 2017;32(4):780–93.

200. Santulli P, Marcellin L, Tosti C, Chouzenoux S, Cerles O, Borghese B, et al. MAP kinases and the inflammatory signaling cascade as targets for the treatment of endometriosis? *Expert Opin Ther Targets.* 2015;19(11):1465–83.

201. Yu X, Wang Y, Tan X, Li M. Upregulation of fibroblast growth factor 2 contributes to endometriosis through SPRYs/DUSP6/ERK signaling pathway. *Acta Histochem.* 2021;123(5):151749.

202. Ji RR, Gereau RW, Malcangio M, Strichartz GR. Nerve growth factor activates a ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Brain Res Brain Res Rev.* 2009;49(18):1841–50.

203. Ding S, Zhu L, Tian Y, Zhu T, Huang X, Zhang X. P2X3 receptor involvement in endometriosis pain via ERK signaling pathway. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184647.

204. Freund A, Patil CK, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* 2011;30(8):1536–48.

205. Fernandes SE, Saini DK. The ERK-p38MAPK-STAT3 signalling axis regulates iNOS expression and salmonella infection in senescent cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11(October):744013.

206. Janelle V, Neault M, Lebel MÈ, De Sousa DM, Boulet S, Durrieu L, et al. p16INK4a regulates cellular senescence in PD-1-expressing human T Cells. *Front Immunol.* 2021;12:698565.

207. Karin M, Clevers H, Drive G, Jolla L. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature.* 2016;529(7586):307–15.

208. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2:17023.

209. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases.

Nat Rev Rheumatol. 2010;6(4):232–41.

210. Cooke JP. Inflammation and its role in regeneration and repair: a caution for novel anti-inflammatory therapies. *Circ Res*. 2019;124(8):1166–8.

211. Granot I, Gnainsky Y, Dekel N. Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome. *Reproduction*. 2012;144(6):661–8.

212. Hickson LJ, Langhi Prata LG, Bobart SA, Evans TK, Giorgadze N, Hashmi SK, et al. Senolytics decrease senescent cells in humans: preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine*. 2019;47:446–56.

213. Justice JN, Nambiar AM, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Pascual R, Hashmi SK, et al. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine*. 2019;40:554–63.

Abstract

Introduction: Endometriosis is characterized by implantation and growth of endometrial tissue outside the uterine cavity. The pathophysiology of endometriosis can be underpinned by inflammatory processes, oxidative stress, and immunological factors. Cell senescence is an irreversible process of cell proliferation suspension and it is associated with immunological changes, increased oxidative stress, and resistance to apoptosis. For this reason, considering the characteristics of endometriosis, such as resistance to apoptosis, the presence of immunological and inflammatory factors and oxidative stress, we believe that there is an accumulation of senescent cells in endometriosis lesions and that peritoneal oxidative stress may be one of the most robust ways to the activation of senescent cells in the endometriosis lesion. **Purpose:** To compare senescent cell biomarkers, oxidative stress secretory phenotype associated with senescence and MAPK pathway proteins in deep endometriosis lesions in relation to the same patient's endometrium. **Methods:** We used biopsies and peritoneal fluid to test the hypothesis. Eutopic endometrium and deep retrocervical lesion samples were collected from 27 patients with endometriosis (14 in the proliferative phase and 13 in the secretory phase). Biopsies were collected from 9 patients in the secretory phase and 10 in the proliferative phase. Of 19 patients without endometriosis samples were also collected. After the collection of biopsies, markers of senescence, oxidative stress, cytokines associated with the secretory phenotype associated with senescence and MAPK pathway proteins were evaluated. **Results:** We found a higher concentration of senescence markers, as well as a more oxidative environment in the lesions compared to the eutopic endometrium of patients with endometriosis. An increase in MAPK pathway proteins in the lesions were observed. The increase in senescence markers, oxidative stress and the MAPK pathway were related to a more inflammatory environment, which was a marker of senescence in endometriotic lesions. **Conclusion:** There is an increase in senescence markers in endometriosis. The accumulation of senescent cells impairs tissue homeostasis, alters cell function and helps to maintain several chronic diseases. To understand the process of senescence in endometriosis may help the development of new therapies.

Keywords: Endometrium; Cell senescence; Oxidative stress; Inflammation