Gabrielle Ferrante Alves de Moraes

INFLUÊNCIA DOS CONTRACEPTIVOS ORAIS EM COMPONENTES DA VIA WNT E METABOLÔMICA DE CÉLULAS-TRONCO ENDOMETRIAIS HUMANAS DERIVADAS DE FLUIDO MENSTRUAL

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pelo Programa de Pós-Graduação em Urologia para obtenção do título de Doutora em Ciências.

São Paulo

2023

Gabrielle Ferrante Alves de Moraes

INFLUÊNCIA DOS CONTRACEPTIVOS ORAIS EM COMPONENTES DA VIA WNT E METABOLÔMICA DE CÉLULAS-TRONCO ENDOMETRIAIS HUMANAS DERIVADAS DE FLUIDO MENSTRUAL

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pelo Programa de Pós-Graduação em Urologia para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador:
Prof. Dr. Edson Guimarães Lo Turco

São Paulo
2023

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ferrante Alves de Moraes, Gabrielle
Influência dos contraceptivos orais em componentes da via wnt e metabolômica de células-tronco endometriais humanas derivadas de fluido menstrual / Gabrielle Ferrante Alves de Moraes. - São Paulo, 2023.
XIII, 60f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Programa de Pós-Graduação em Urologia.

Título em inglês: Influence of oral contraceptives on Wnt pathway's components and metabolomics of human endometrial stem cells derived from menstrual fluid.

1. Fluido menstrual. 2. Contraceptivo Hormonal Oral . 3. Células-tronco. 4. Via de sinalização Wnt. 5. Metabolômica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM UROLOGIA

Chefe do Departamento:
Prof. Dr. José Carlos Costa Baptista Silva

Chefe da Disciplina:
Prof. Dr. Fernando Gonçalves de Almeida

Coordenadora do curso de pós-graduação:
Profa. Dra. Paula Intasqui Lopes

Gabrielle Ferrante Alves de Moraes

INFLUÊNCIA DOS CONTRACEPTIVOS ORAIS EM COMPONENTES DA VIA WNT E METABOLÔMICA DE CÉLULAS-TRONCO ENDOMETRIAIS HUMANAS DERIVADAS DE FLUIDO MENSTRUAL

Presidente da banca:
Prof. Dr. Edson Guimarães Lo Turco

Banca examinadora:
Profa. Dra. Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga
Prof. Dr. Diogo de Oliveira Silva
Prof. Dr. Felipe Perecin
Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

Suplente:
Profa. Dra. Paula Intasqui Lopes
Prof. Dr. Valter Luiz Maciel Junior

Agradecimentos

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus amados pais, **Herika e Gilson**, que me ofereceram desde sempre a oportunidade de estudar e por me darem tanto amor. Ao meu marido **Bruno**, por todo amor e companheirismo ao longo de minha jornada. Agradeço a toda minha família que direta ou indiretamente fizeram parte desta trajetória.

Ao **Prof. Dr. Edson Guimarães Lo turco**, pela orientação, aprendizado, confiança e paciência durante os anos de Doutorado, fazendo parte de meu crescimento profissional e tornando a vida acadêmica um pouco mais leve.

Aos coordenadores do laboratório LEAF, **Profa. Dra. Paula Intasqui Lopes, Profa. Dra. Mariana Camargo, Profa. Dra. Mariana Pereira Antoniassi** e **Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla**, por todo aprendizado adquirido ao longo desses anos no Programa de Pós-Graduação em Urologia.

A **Profa. Dra. Mariana Camargo, Profa. Dra. Marimélia Aparecida Porcionatto** e ao **Prof. Dr. Diogo de Oliveira Silva**, pelas sugestões e críticas durante o exame de Qualificação.

A **Camila Teixeira Silva**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Urologia, por toda ajuda nos momentos em que precisei, sempre tão empática, eficiente e gentil.

A todas as voluntárias que aceitaram participar deste estudo para que eu pudesse realizar os objetivos deste trabalho.

Aos meus companheiros de laboratório **Dóris**, **Luana, Marcella**, **Ana Carolina**, **Karla** e **Valter** por me auxiliarem durante os meus experimentos, me ajudarem nos dias de frustração, fazendo meus dias de estudo mais divertidos, além dos compartilhamentos de dúvidas, ideias e aprendizados. Obrigada pelo companheirismo, agradável convívio e por fazerem parte dos meus dias.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo auxilio financeiro em forma de bolsa de Doutorado.

Obrigada àqueles que de alguma forma participaram deste trabalho e aos que por ventura possa ter esquecido. Sou imensamente grata a todos.

SUMÁRIO

Agradecimentos vi
LISTAS DE FIGURAS x
LISTA DE TABELAS xi
RESUMO xii
ABSTRACT xiii
1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Ciclo menstrual e contraceptivos hormonais orais 1
1.2 Células-tronco endometriais 4
1.3 Via de Sinalização Wnt no Trato Reprodutor Feminino 6
2 HIPÓTESE 12
3 OBJETIVO 12
3.1 Objetivo geral 12
3.2 Objetivos específicos 12
4 MATERIAL E MÉTODOS 13
4.1 Delineamento experimental 13
4.2 Constituição dos grupos 13
4.3 Isolamento e cultivo das células-tronco endometriais 14
4.4 Diferenciação Celular 15
4.4.1 Diferenciação Adipogênica 15
4.4.2 Diferenciação Osteogênica 15
4.4.3 Diferenciação Condrogênica 16
4.5 Ensaio de Citometria de Fluxo 16
4.6 Subestudo I 17
4.6.1 Extração de RNA total 17
4.6.2 Quantificação de RNA 18
4.6.3 Desenho dos primers 18
4.6.4 RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase a Partir de Transcrição Reversa) 18
4.6.5 PCR em Tempo Real 19
4.6.6 Ensaio de Citometria de Fluxo 19
4.7 Subestudo II 20

4.7.1 Metabolômica 20
4.8 Análise estatística 21
5 RESULTADOS 24
5.1 Descrição dos grupos de estudo 24
5.2 Caracterização das células-tronco endometriais 25
5.3 Subestudo I 30
5.3.1 Análise de expressão gênica 30
5.3.2 Análise de expressão proteica 31
5.4 Subestudo II 33
5.4.1 Metabolômica 33
6 DISCUSSÃO 36
7 CONCLUSÃO 46
8 REFERÊNCIAS 47
ANEXOS 53

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo Menstrual.....3

Figura 2. Sinalização Wnt canônica 9

Figura 3. Fluxograma do estudo. 23

Figura 4. Morfologia das CTEs em P0.....26

Figura 5. Expressão dos marcadores de superfície celular mesenquimais, CD105 e CD146, e hematopoiéticas, CD34 e CD45, nos grupos CT e CHO por Citometria de Fluxo 28

Figura 6. Evidência morfológica após 21 dias de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica de CTEs em P1 29

Figura 7. Expressão gênica por PCR em Tempo Real de componentes da via de sinalização Wnt, Wnt3a, Wnt7a e β-Catenina nos grupos CT e CHO.....30

Figura 8. Expressão proteica de Wnt3a, Wnt7a e β-Catenina nos grupos CT e CHO por Citometria de Fluxo 32

Figura 9. Gráfico da análise discriminante dos quadrados mínimos da metabolômica de células e de meio de cultivo dos grupos CT e CHO 34

Figura 10. *Score* dos VIPs.....35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados.....18

Tabela 2. Características gerais das voluntárias ao estudo.....25

Tabela 3. Caracterização das CTEs por Citometria de Fluxo 27

Tabela 4. Dados descritivos dos marcadores de células mesenquimais e hematopoiéticas 28

Tabela 5. Dados descritivos da expressão gênica de Wnt3a, Wnt7a e β-Catenina nos grupos CT e CHO 31

Tabela 6. Dados descritivos da expressão proteica de Wnt3a, Wnt7a e β-Catenina nos grupos de estudo.....33

Tabela 7. Metabólitos encontrados nas CTEs e em seu meio de cultivo (secretôma)..... 35

RESUMO

Objetivo: Estudar o efeito do uso de contraceptivo hormonal oral (CHO) em células-tronco endometriais humanas (CTEs) por meio do isolamento e caracterização *in vitro*, da via Wnt e da metabolômica do meio de cultivo condicionado e das próprias células. **Métodos:** Este estudo foi dividido em 2 subestudos. Foram estudados dois grupos de voluntárias de acordo com o uso de CHO, sendo 10 voluntárias constituindo o grupo sem uso de contraceptivo (CT) e 7 voluntárias constituindo o grupo com uso de contraceptivo (CHO). Foi feito o isolamento de CTEs a partir de fluido menstrual e as células foram caracterizadas através de marcadores de superfície celular, mesenquimais (CD105 e CD146) e hematopoiéticos (CD45 e CD34), e por ensaio de diferenciação celular adipogênica, condrogênica e osteogênica, para posterior utilização nos subestudos. No subestudo I, componentes da via de sinalização Wnt, Wnt3a, Wnt7a e β-Catenina, foram avaliados quanto à sua expressão gênica, por PCR em Tempo Real, e quanto à sua expressão proteica, por Citometria de Fluxo. No subestudo II, foram avaliados os metabólitos presentes nas CTEs e aqueles secretados no meio de cultivo durante seu cultivo *in vitro*, a partir de análise metabolômica por MALDI-TOF. **Resultados:** Durante o cultivo celular, as CTEs permaneceram fenotipicamente estáveis, apresentaram alta expressão dos marcadores de superfície mesenquimais e baixa expressão dos hematopoiéticos, além de mostrarem potencial de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica. Os resultados mostraram que o nível de expressão gênica de Wnt3a, Wnt7a e β-catenina no grupo CHO foi significativamente menor do que no grupo CT, porém a expressão proteica não revelou diferenças significativas entre os grupos. Na análise para avaliar os efeitos do CHO na expressão de metabólitos, os resultados demonstraram que o grupo CT distinguiu-se claramente do grupo CHO. O perfil metabolômico das células e de seu secretôma apresentou diferença entre os grupos. **Conclusão:** O uso de CHO altera a expressão gênica de Wnt3a, Wnt7a e β-Catenina em CTEs, porém não altera sua expressão proteica. A análise metabolômica permitiu inferir que o metabolismo celular e, principalmente, secretômico das CTEs sofre alterações sob influência do CHO.

Palavras-chave: 1.Fluido menstrual. 2.Contraceptivo Hormonal Oral 3.Células-tronco. 4.Via de sinalização Wnt. 5.Metabolômica.

ABSTRACT

Objective: To study the effect of oral hormonal contraceptives (OHC) use on human endometrial stem cells (ESCs) through in vitro isolation and characterization, the Wnt pathway and metabolomics of conditioned culture medium and cells themselves. **Methods:** This study was divided into 2 substudies. Two volunteers groups were studied according to OHC use, with 10 volunteers constituting the group without contraceptive use (CT) and 7 volunteers constituting the group using contraceptives (OHC). ESCs were isolated from menstrual fluid and the cells were characterized by cell surface markers, mesenchymal (CD105 and CD146) and hematopoietic (CD45 and CD34), and by adipogenic, chondrogenic and osteogenic cell differentiation assay to subsequent use in substudies. In substudy I Wnt signaling pathway components, Wnt3a, Wnt7a and β-Catenin, were evaluated for their gene expression by Real Time PCR and for their protein expression by Flow Cytometry. In substudy II the metabolites present in ESCs and those secreted in the culture medium during in vitro cultivation were evaluated based on metabolomic analysis by MALDI-TOF. **Results:** During cell culture ESCs remained phenotypically stable, showed high expression of mesenchymal surface markers and low expression of hematopoietic markers in addition to showing potential for adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation. The results showed that Wnt3a, Wnt7a and β-catenin gene expression level in OHC group was significantly lower than in the CT group, however the protein expression did not reveal significant differences between groups. In the analysis to assess the OHC effects on metabolite expression, the results demonstrated that CT group was clearly distinguished from OHC group. The cells and secretome metabolomic profile differed between groups. **Conclusion:** The OHC use alters the Wnt3a, Wnt7a and β-Catenin gene expression in ESCs, but does not alter their protein expression. The metabolomic analysis allowed inferring that ESCs cellular and mainly secretory metabolism undergoes changes under OHC influence.

Key-words: 1.Menstrual fluid. 2.Oral hormonal contraceptive. 3.Stem cells. 4.Wnt signaling pathway. 5. Metabolomics.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ciclo menstrual e contraceptivos hormonais orais

Mulheres em idade reprodutiva estão expostas a flutuações nos hormônios esteroides devido ao ciclo menstrual (1). O ciclo menstrual normal é o resultado de um eixo hipotálamo-hipofisário-ovariano altamente coordenado com *feedbacks* hormonais que levam à formação de um folículo ovariano dominante, ovulação e, na ausência de fertilização, descamação do revestimento endometrial em intervalos regulares (2, 3).

O ciclo menstrual normal consiste em três fases: a fase folicular (proliferativa), a fase ovulatória e a fase lútea (ou secretora). O estrogênio é o principal hormônio da fase folicular, enquanto a progesterona é o principal hormônio da fase lútea (1, 3). A Figura 1 mostra a sequência ordenada de eventos hormonais que se desenrola ao longo de um ciclo menstrual. Um ciclo ovulatório normal pode ser tão curto quanto 24 dias ou tão longo quanto 35 dias. Então, considerando um ciclo regular de 28 dias, um novo ciclo se inicia no primeiro dia da menstruação que, por convenção, é considerado o dia 1 do ciclo e marca o início da fase folicular. No início desta fase, os hormônios estrogênio e progesterona estão em níveis baixos e a parede do endométrio está bem fina (1). Ocorre, então, a estimulação para liberação pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo que age sob a hipófise anterior, resultando na secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) pela mesma. O FSH faz com que os folículos comecem a se desenvolver, crescendo e amadurecendo. Os folículos começam, então, a produzir estrogênio. O estrogênio age sobre o útero, tornando o endométrio mais espesso, preparando-o para uma possível implantação. O pico de estrogênio ocorre um dia antes da ovulação. No momento do pico de estrogênio, outro hormônio é liberado pela hipófise, o hormônio luteinizante (LH), e seu pico ocorre exatamente no meio do ciclo, no 14º dia. A liberação do LH completa o processo de maturação do folículo ovulatório, ocorrendo seu rompimento e a ovulação. No momento da ovulação, a temperatura corporal da mulher se eleva discretamente (1-6).

Após o rompimento do folículo ovulatório, as células residuais deixadas são chamadas de corpo lúteo, estrutura responsável pela produção de estrogênio e,

principalmente, de progesterona, cuja ação acentua o espessamento do endométrio, promovendo a sua vascularização. Após a ovulação, o estrogênio retorna a níveis próximos da fase folicular inicial e irá se elevar novamente através da produção pelo corpo lúteo. A ovulação e a formação do corpo lúteo marcam o início da fase lútea do ciclo (2, 4, 6). Durante toda a etapa final da fase lútea, após a liberação do óvulo, o corpo lúteo permanece produzindo progesterona, que age inibindo a secreção de LH pela hipófise (1, 2). Como a progesterona inibe o LH, se o óvulo não for fecundado, a queda do LH faz com que o corpo lúteo comece a involuir e degenerar (transforma-se em corpo albicans), o que por sua vez provoca a queda na produção de progesterona e estrogênio pelo corpo lúteo. Sem esses hormônios, a parede espessa do endométrio não consegue mais se sustentar, ocorre a menstruação e o ciclo se reinicia novamente. Em média, a menstruação dura cerca de 5 dias (1-3).

Os hormônios esteroides, estrogênio e progesterona, são os principais reguladores da proliferação celular, produção de proteínas secretoras e diferenciação celular nos tecidos reprodutivos, incluindo o endométrio. A progesterona também desempenha um papel fundamental na ovulação, implantação e estabelecimento e manutenção da gravidez. Durante a fase secretora, a progesterona promove a decidualização das células do estroma endometrial, associada a características morfológicas e funcionais distintas (7).

A maioria das mulheres faz uso de contraceptivos hormonais orais (CHOs) em algum momento durante seus anos reprodutivos. Os CHOs são a classe de medicamentos que têm os maiores efeitos no ciclo menstrual de uma mulher e podem ser utilizados a curto ou a longo prazo (1, 8, 9). Os CHOs suprimem a produção de estrogênio e progesterona endógenos através da administração de hormônios exógenos, contendo etinilestradiol (forma sintética do estrogênio natural) em combinação com progestina (forma sintética da progesterona natural) ou contendo apenas progestina (1, 9-11). Como mecanismo primário, os CHOs impedem a ovulação através da inibição por *feedback* negativo no hipotálamo. Seu uso está associado a uma redução acentuada na produção endógena de estrogênio e progesterona. Enquanto os hormônios endógenos são inibidos, os hormônios exógenos fornecidos por CHOs exercem atividade biológica. A maioria dos CHOs envolve um ciclo contraceptivo recorrente de 21 dias consecutivos de uso da pílula anticoncepcional (administração de estrogênio e progesterona sintéticos), seguidos

por uma semana sem pílula (ou uma semana de placebos inertes sem hormônio). A menstruação ocorre durante a semana "inativa" (1, 9).

Foi comprovado que o 17β-estradiol (E2) pode interferir na modulação funcional, na proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais (CTMs) e outros tipos de células (10, 12, 13).

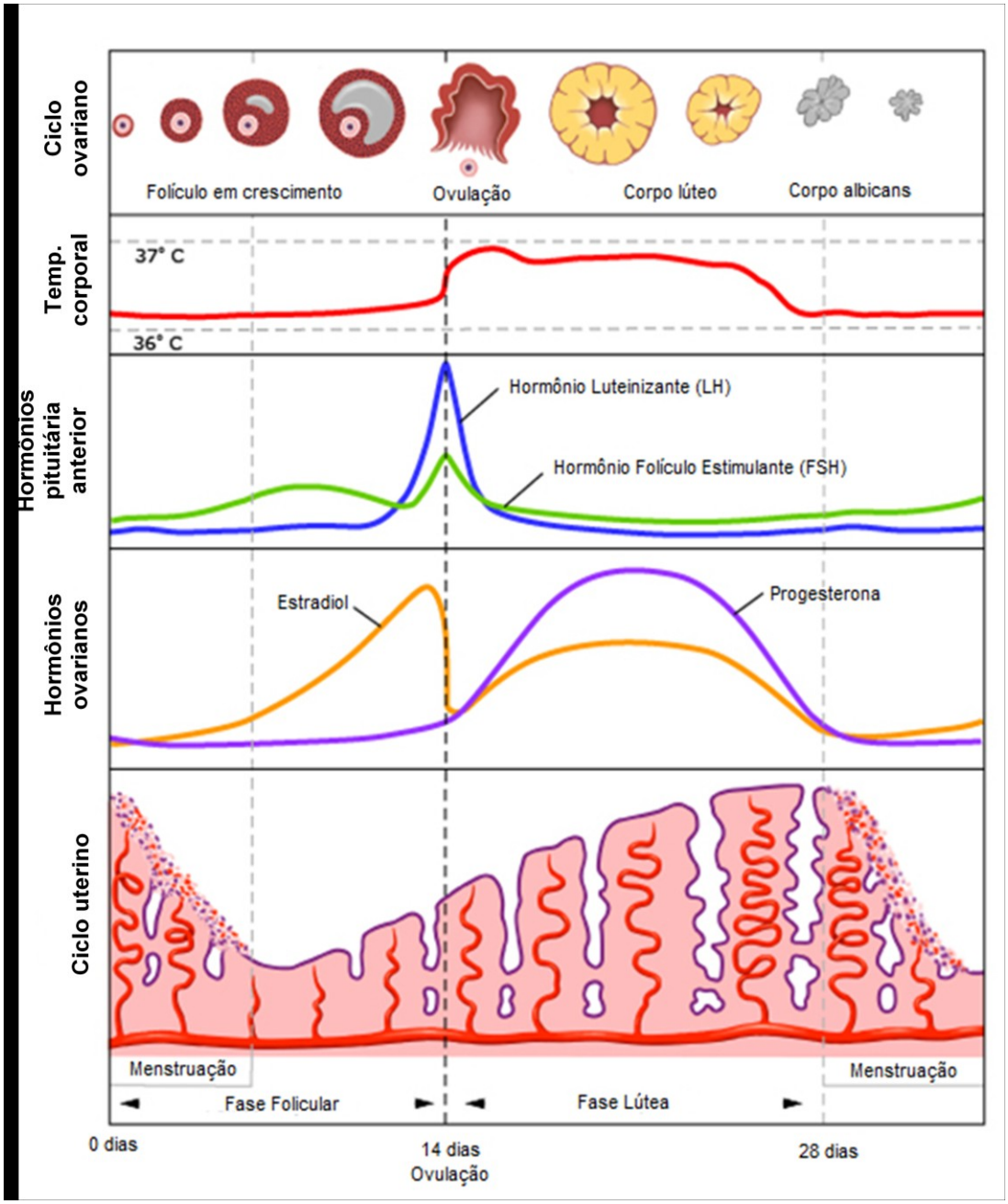

Figura 1. Ciclo Menstrual. Padrão típico de alterações em hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), estradiol e progesterona, mostrado ao longo de um ciclo menstrual padrão de 28 dias. A linha vertical tracejada indica onde ocorre a ovulação. O sangramento menstrual (menstruação) começa no dia 1 e dura cerca de 5 dias, em média.
Adaptado de UpToDate, Inc, 2021.

1.2 Células-tronco endometriais

As células-tronco (CTs) são células indiferenciadas que possuem a capacidade de se auto-renovar e, em condições específicas, podem se diferenciar em vários tipos celulares (14, 15). São classificadas de acordo com a sua origem, podendo ser embrionárias ou adultas e quanto à sua potência de diferenciação, podendo ser totipotentes (dão origem a tipos de células embrionárias e extra-embrionárias), pluripotentes (capazes de produzir qualquer tipo de célula adulta), multipotentes (com potencial multilinhagens) e unipotentes (capazes de se diferenciar em uma única linhagem) (16, 17).

As CTs residem em microambientes especializados, também chamados de nichos, que regulam suas decisões de divisão e destino celular. O nicho é um sistema dinâmico onde as CTs interagem com diferentes componentes do microambiente, como células (outras CTs, células diferenciadas), fatores secretados (quimocinas, hormônios, receptores de fatores de crescimento), matriz extracelular (fibras de colágeno, fibronectina), fatores físicos, hipóxia/metabolismo e o meio geral (inflamação, cicatrização, alteração hormonal). O sistema de nicho dinâmico sustenta a ideia de que as CTs residem em locais específicos, recebendo diferentes estímulos que determinarão seu comportamento (18).

O útero humano pode ser dividido em duas camadas funcionais: o miométrio e o endométrio. O endométrio é um tecido dinâmico, que facilita a implantação, desenvolvimento e crescimento do embrião e pode ser dividido em duas camadas: uma funcional e uma basal. A camada funcional, que é eliminada mensalmente durante a menstruação, é reabastecida pela camada basal, que persiste no próximo ciclo, durante a fase proliferativa do ciclo menstrual (19, 20). O tecido endometrial responde a estímulos hormonais de maneira coordenada espacial e temporal, caracterizada por extenso diálogo cruzado para regular o desenvolvimento e a homeostase do tecido, sofrendo de 400 a 500 ciclos de eliminação e regeneração ao longo da vida de uma mulher (1, 5, 21, 22). Trata-se de um órgão altamente regenerativo, de tecido multicelular hormônio-dependente constituído por células epiteliais luminais, células estromais e glândulas. O estroma é composto por células mesenquimais de suporte e inclui fibroblastos estromais, a vasculatura e os leucócitos (1, 22). A renovação endometrial é crucial no preparo do útero para

implantação do embrião e manutenção da gravidez em humanos e animais (21). Os processos envolvidos no reparo endometrial incluem inflamação, angiogênese, formação e remodelação de tecidos (18). Esta capacidade regenerativa cíclica sugere que o endométrio tem uma base de CTs que suporta a manutenção/ regeneração/ remodelação do tecido frente a estímulos ambientais na menstruação (18, 20, 21, 23). Consistentemente, as CTs na menstruação (fase folicular) exibem maiores habilidades de autorrenovação e proliferação do que aquelas na fase lútea (23).

O volume médio de fluido menstrual durante um período menstrual mensal é de 35 mililitros. Cerca de metade deste fluido é sangue. Este sangue contém sódio, cálcio, fosfato, ferro e cloreto, cuja extensão depende individualmente da mulher. Além do sangue, o fluido consiste em muco cervical, secreções vaginais e tecido endometrial (24). A presença de CT no endométrio foi especulada pela primeira vez por Prianishnikov em 1978 (22, 25). Em 2004, uma pequena população de células epiteliais endometriais e estromais humanas foram isoladas e cultivadas, formando unidades formadoras de colônias e foram responsáveis pela regeneração cíclica de glândulas endometriais e do estroma. (22, 26). Em 2007, as células-tronco endometriais (CTEs) foram identificadas e caracterizadas a partir de fluido menstrual humano através de procedimento de coleta não invasivo (mesmo método de coleta de urina), demonstrando alta taxa de proliferação, multipotência, baixa imunogenicidade e baixo risco de anormalidades cariotípicas (14, 22, 27). Essas células são liberadas dos vasos da parede uterina à medida que o tecido uterino se substitui e regenera seu revestimento endometrial a cada ciclo menstrual, exibindo propriedades parecidas com CTMs (28, 29). A regeneração endometrial começa na menstruação, portanto, as CTEs são ativadas nesta fase para o reparo endometrial (23, 30).

As CTMs são células multipotentes, não hematopoiéticas e com propriedades de autorrenovação e de diferenciação em tecidos mesenquimais (29, 31). Já foram coletadas e expandidas *in vitro* a partir de diversos tecidos adultos e perinatais, incluindo medula óssea, tecido adiposo, sangue periférico, fluido menstrual, polpa de dentes decíduos, tecido de cordão umbilical, geleia de *Wharton*, sangue de cordão umbilical, tecidos placentários, leite materno, entre outros (31). As CTMs derivadas de fluido menstrual proliferam mais rapidamente em comparação com as CTMs

derivadas da medula óssea e de cordão umbilical (28). Sobre suas características de cultivo *in vitro*, as CTMs devem ser aderentes ao plástico e apresentar morfologia fibroblastóide quando mantidas em condições padrão de cultivo. Ademais, devem expressar marcadores de superfície mesenquimais e não expressar marcadores de superfície hematopoiéticos, além de serem capazes de diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* mediante meios de indução específicos (31-34).

As CTEs pertencem à família das CTMs e são capazes de expressar marcadores mesenquimais e mostrar as características das CTs/estromais mesenquimais. São positivas para CD44, CD73, CD90, CD105 e CD146, enquanto são negativas para os marcadores CD31, CD34, CD45 e CD133 (12, 22, 33).

As características únicas das CTMs podem estar relacionadas à vias de sinalização celular que estão envolvidas na determinação do destino, regulação da proliferação e diferenciação celular. Uma das principais vias de transdução de sinal associada ao desenvolvimento de CTs é a sinalização Wnt, que pode regular genes alvos à jusante e mediar a proliferação e diferenciação de CTs (35).

1.3 Via de Sinalização Wnt no Trato Reprodutor Feminino

O termo Wnt foi derivado da relação de origem comum entre o gene *wingless* de Drosophila (também conhecido como wg) e o gene de camundongo int-1, ambos codificando proteínas ligantes que são capazes de iniciar o processo de sinalização Wnt (36, 37). Wnts são glicoproteínas secretadas (38) essenciais para a comunicação célula a célula (39). Já foram identificados ao menos 19 tipos de Wnts, 12 subfamílias Wnt conservadas, além de famílias de antagonistas secretoras e receptoras (40). Do ponto de vista evolutivo, a sinalização Wnt é altamente conservada em diferentes espécies, que variam de invertebrados a mamíferos, e contribui significativamente para a embriogênese, homeostase e regeneração de tecidos adultos (41, 42). Também é crucial para manter a estabilidade genética, além de desempenhar um papel importante na determinação do destino, proliferação, diferenciação, apoptose e motilidade celular, incluindo a manutenção das CTs (43, 44).

A sinalização Wnt é categorizada em duas vias. Uma é a via dependente de β-catenina, a via canônica ou Wnt/β-catenina, enquanto a segunda é a via de

sinalização independente de β-catenina, a via não canônica (45). A sinalização Wnt canônica inicia-se com o acoplamento da proteína Wnt ao domínio N-terminal do receptor *Frizzled*. Essa ligação promove a associação deste com o correceptor LRP5/6 (*lipoprotein receptor related protein 5/6*). O contato da proteína Wnt com o receptor *Frizzled* é crucial para a ativação da sinalização Wnt (15, 44). Três serina-treonina quinases constitutivamente ativas, CK1 (*casein kinase* 1), GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) e *Cyclin Y*, induzem a fosforilação da cauda citoplasmática de LRP5/6, ativando, desta forma, uma proteína citoplasmática denominada DVL (*Dishevelled*). A DVL ativada induz a inativação de um complexo de destruição da β-Catenina (ubiquitinização) que consiste de Axin, APC (*adenomatous polyposis coli*), GSK3 e CK1 (as mesmas quinases que atuam na fosforilação de LRP) (39, 40, 44). Sinais Wnt levam à inibição da ubiquitinização de β-Catenina através de DVL, o que leva a um aumento nos níveis de β-Catenina citoplasmática, a qual transloca-se para o núcleo para formar um complexo com os fatores de transcrição TCF (*T-cell factor*) e LEF (*lymphoid enhancer factor*), modulando a transcrição de genes alvos (Figura 2) (41, 44). O complexo de destruição APC/Axin citoplasmático regula a via de sinalização Wnt através do controle da estabilização de β-Catenina citoplasmática, desempenhando um papel chave na cascata da via de sinalização Wnt canônica. A proteína Axin atua como o arcabouço deste complexo, interagindo com β-Catenina, com a proteína APC, com CK1 e GSK3 (44, 46). Nas células que não são estimuladas por Wnt, ou seja, quando os receptores *Frizzled*/LRP5/6 não estão envolvidos, GSK3 e CK1 fosforilam a região amino terminal da β-Catenina, que é então vinculada a uma E3 ubiquitina ligase, a β-TrCP, provocando poli-ubiquitinização de β-Catenina para rápida destruição pelo sistema proteassomo, prevenindo, desta forma, a ativação de genes alvo no núcleo (Figura 2) (44, 47, 48). A via não canônica pode ser subcategorizada na via de polaridade da célula planar ou na via Wnt/Ca^{2+} de acordo com seus efetores a jusante (49).

A via de sinalização Wnt/β-catenina é uma via bem elucidada que é apresentada em vários tecidos autorrenováveis (50) e desempenha um papel crucial na regulação do desenvolvimento embrionário, pós-natal e crescimento oncogênico de muitos tecidos, além de seu papel no desenvolvimento dos ovários e oogênese (51-53). Trata-se de uma via fortemente estudada como regulador crítico de CTs adultas durante a homeostase, além de ser um dos reguladores mais importantes do

destino das CTMs (15, 35, 54, 55). Em CTMs, a ativação da via de sinalização Wnt canônica promove a proliferação e controla o destino celular (23). A sinalização Wnt/β-catenina envolve principalmente a regulação da proliferação celular, enquanto a polaridade e a mobilidade da célula são reguladas pela via não canônica (56).

Já foi evidenciado que componentes para ativação da sinalização Wnt, como ligantes, receptores, correceptores e inibidores, estão presentes em CTMs e podem ser estimulados. A sinalização Wnt também já foi identificada no controle da diferenciação de CTs hematopoiéticas, CTs da pele, bem como na regulação da miogênese, condrogênese e adipogênese. A via de sinalização Wnt/β-catenina desempenha um papel na expansão populacional e na autorrenovação de CTs adultas em uma variedade de órgãos de mamíferos (57-60).

Os ligantes Wnts desempenham um importante papel no desenvolvimento e funcionamento do endométrio (61). Foi postulado que os hormônios esteroides atuam através da via de sinalização Wnt canônica no endométrio humano. Níveis aumentados de estrogênio ativam a via, enquanto níveis elevados de progesterona inibem a via, contrabalançando assim a proliferação aumentada de estrogênio. A via Wnt é crítica para o desenvolvimento uterino e desempenha um papel importante durante a implantação e decidualização em camundongos (47). A via é importante para a iniciação, crescimento, padronização e diferenciação do ducto de Müller em vagina, colo do útero, útero e oviduto. Em resumo, sugere-se que os hormônios sexuais regulem a sinalização Wnt/β-catenina no endométrio para manter o equilíbrio mensal entre a proliferação induzida por estrogênio e a diferenciação induzida por progesterona (19).

Estudos já descreveram a expressão de ligantes Wnt ativando a via de sinalização durante o desenvolvimento endometrial. Esses ligantes exercem um papel correspondente na reformação do endométrio durante o ciclo menstrual, além de desempenharem um papel importante na proliferação e diferenciação celular (62, 63). A via participa do desenvolvimento e manutenção funcional do endométrio e modula a atividade de autorrenovação das CTEs (64). A receptividade uterina antes da implantação e o início do processo de implantação são regulados por genes Wnt. Os ligantes Wnt1, Wnt3, Wnt3a e Wnt7a, que ativam a sinalização canônica (Wnt/β-catenina) e Wnt2, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7b e Wnt11, que ativam a via de sinalização não canônica, mostraram um importante papel em eventos de peri-

implantação em camundongos, humanos e ovelhas (61). O papel dos ligantes Wnt, particularmente Wnt7a é bem conhecido na formação das glândulas uterinas, importantes na receptividade endometrial, implantação e decidualização (63, 65). O ligante Wnt3a foi mostrado como iniciador da diferenciação da linhagem do trofectoderma, responsável pela formação dos tecidos de comunicação materno-fetal (66). Tulac *et al*. demonstraram que Wnt2, Wnt3, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt8b, Fz6, LRP6, FrpHE, Dkk-1, Dvl-1, GSK-3 e β-catenina são expressos ao longo do ciclo menstrual (63).

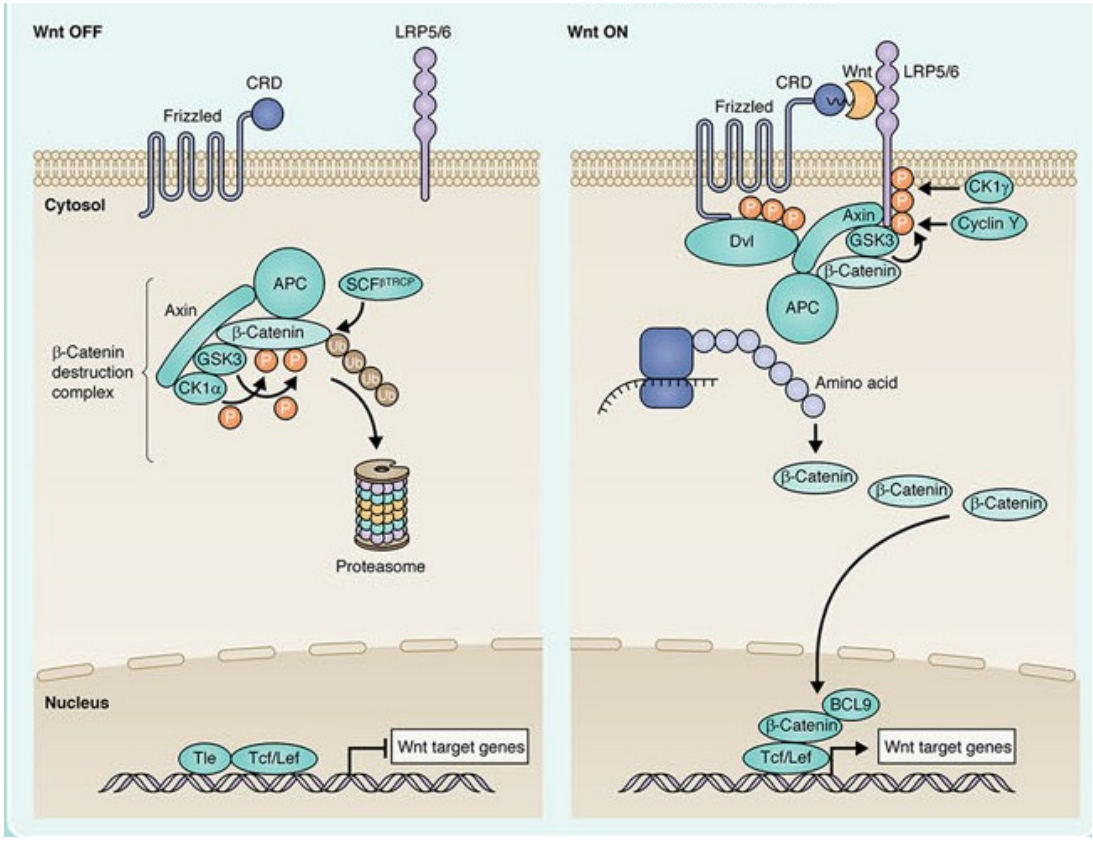

Figura 2. Sinalização Wnt canônica. A β-catenina citoplasmática é constitutivamente degradada por um grupo de proteínas conhecido como complexo de destruição de β-catenina. A atividade do complexo de destruição, que consiste em CK1, GSK3, APC e Axin, na ausência do ligante Wnt, produz uma β-catenina hiperfosforilada que é alvo de ubiquitinação e degradação no proteassoma. A família de proteínas repressoras de transcrição TLE (Groucho) inibe genes alvos Wnt, reprimindo o complexo de fatores de transcrição TCF/LEF. (Wnt on) Proteínas extracelulares Wnts se ligam ao complexo receptor *Frizzled* e correceptor LRP5/6. A sinalização via complexo receptor *Frizzled* e correceptor LRP5/6 na presença de estimulação Wnt causa fosforilação concomitante da cauda citoplasmática de LRP5/6 mediada por CK1, GSK3 e *Cyclin Y*. DVL é atraído para a membrana e acopla-se a *Frizzled*. Axin e APC também são recrutados. O recrutamento e inativação de componentes do complexo de destruição de β-catenina para a membrana plasmática leva ao acúmulo de β-catenina citoplasmática. A β-catenina se difunde no núcleo onde se combina com o complexo de fatores de transcrição TCF/LEF para modular a transcrição de genes alvos Wnt. CK1: *casein kinase* 1; GSK3: *glycogen synthase kinase 3*; TCF: *T-cell factor*; LEF: *lymphoid enhancer factor;* LRP5/6: *lipoprotein receptor related protein 5/6*; DVL: *Dishevelled*.
Steinhart & Angers, 2018.

1.4 Metabolômica

As CTs compartilham vários genes essenciais e vias de sinalização (Hedgehog, Wnt, Notch, fosfatidilinositol 3-quinase/ fosfatase e vias de sinalização de fator nuclear-κB) como capacidade de *stemness*, ou seja, elas podem preservar sua linhagem, interagir com o meio ambiente e cruzar com as células adjacentes para manter o equilíbrio entre repouso, proliferação e restauração, por meio da habilidade de *stemness* (67). A abordagem metabolômica pode aumentar nossa compreensão sobre essas alterações químicas relacionadas aos processos celulares, incluindo proliferação, adaptação ambiental, diferenciação e autorrenovação. A metabolômica consiste na análise abrangente de um grande número de metabólitos em sistemas biológicos, determinando flutuações nos níveis desses metabólitos em amostras biológicas (biofluidos, tecidos ou células), por meio de várias técnicas direcionadas ou não direcionadas. Características metabólicas desviantes podem abrir caminho para entender melhor a resposta do organismo e revelar biomarcadores metabólicos do estado biológico (16, 31, 67). Desta forma, a metabolômica pode ser uma ferramenta eficaz para o diagnóstico precoce de diversas doenças, por meio da identificação de biomarcadores prognósticos (68).

Sabe-se que as CTMs secretam um espectro de fatores bioativos (secretôma), como proteínas, metabólitos, citocinas de sinalização celular, quimiocinas, moléculas de adesão celular, mediadores lipídicos, interleucinas, fatores de crescimento, hormônios, exossomos e microvesículas, considerados protagonistas no reparo e regeneração tecidual por meio de suas ações parácrinas que medeiam a sinalização célula a célula. O secretôma desempenha um papel fundamental na influência das comunicações cruzadas entre as células e os tecidos circundantes, a fim de mediar uma função biológica (31, 68). Metabólitos de CTMs estão envolvidos em vias metabólicas que produzem sinais vitais para a autorrenovação, diferenciação e outras propriedades das CTMs. O estado indiferenciado e o estado diferenciado das CTMs podem ser distinguidos pelo seu perfil metabólico (67).

O metaboloma pode refletir a influência ambiental em uma amostra biológica (68, 69). Diferentes tipos de CTMs compartilham algumas propriedades devido ao

seu perfil de expressão gênica. Porém, CTMs de diferentes fontes possuem diferentes secretômas e perfis metabólicos (67).

Em conjunto às vantagens, como fácil coleta, grande disponibilidade de amostra, alto rendimento e grande potencial de proliferação, as CTMs derivadas de fluido menstrual têm sido propostas como uma forma de entender o comportamento do ambiente endometrial (24, 68). Este estudo visa, então, estudar o efeito do CHO em componentes da via de sinalização Wnt e no perfil metabolômico e secretômico de CTEs humanas. Esta avaliação pode auxiliar na busca por novos marcadores de receptividade e na descoberta de novos processos relacionados ao crescimento endometrial e janela de implantação. Além disso, avaliar a possível alteração metabólica das CTEs pode contribuir para um conhecimento mais profundo sobre o comportamento dessas células quando expostas a fatores exógenos. É esperado que o CHO influencie o comportamento da via de sinalização Wnt e que altere o perfil metabolômico dessas células.

2 HIPÓTESE

O uso de contraceptivos hormonais orais altera a expressão gênica e proteica de componentes da via de sinalização Wnt e o metaboloma de células-tronco endometriais.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Estudar o efeito do uso de contraceptivo hormonal oral em células-tronco endometriais humanas por meio do isolamento e caracterização *in vitro*, da via Wnt e da metabolômica do meio de cultivo condicionado e das próprias células.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do contraceptivo hormonal oral na expressão gênica de Wnt3a, Wnt7a e β-Catenina em células-tronco endometriais de mulheres em idade reprodutiva.
- Avaliar o efeito do contraceptivo hormonal oral na expressão proteica de Wnt3a, Wnt7a e β-Catenina em células-tronco endometriais de mulheres em idade reprodutiva.
- Avaliar o efeito do contraceptivo hormonal oral no perfil metabolômico e secretômico de células-tronco endometriais de mulheres em idade reprodutiva.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Estudos Avançados em Fertilidade (LEAF) da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

A fim de atender o objetivo geral, este estudo foi dividido em 2 subestudos. Foram estudados dois grupos de voluntárias de acordo com o uso de CHO. Foi feito o isolamento de CTEs a partir de fluido menstrual e as células foram caracterizadas para posterior utilização nos experimentos. No subestudo I, componentes da via de sinalização Wnt foram avaliados quanto à sua expressão gênica e proteica nas CTEs. No subestudo II, foram avaliados os metabólitos presentes nas CTEs e aqueles secretados no meio de cultivo (secretôma) durante seu cultivo *in vitro*, a partir da análise metabolômica.

O esquema ilustrativo do estudo esta representado na Figura 3.

4.2 Constituição dos grupos

Foi coletado fluido menstrual através de coletor menstrual de 17 mulheres voluntárias, sendo 10 em idade reprodutiva, entre 20 e 35 anos, que não faziam uso de CHO (grupo controle - CT) e 7 em idade reprodutiva, entre 20 e 35 anos, que faziam uso de CHO (grupo CHO) por ao menos 1 ano.

Como critérios de inclusão, foram aceitas somente mulheres entre 20 e 35 anos, com ciclos menstruais regulares e que apresentassem índice de massa corpórea normal (entre 18,5 e 24,99 kg/m^2). Como critérios de exclusão, não foram aceitas mulheres que fossem portadoras do vírus HIV, do vírus da hepatite B ou C, que estivessem infectadas por qualquer outra DST, que fossem portadoras da síndrome dos ovários policísticos ou fizessem uso de outro método contraceptivo hormonal que não fossem os CHOs.

Todas as voluntárias assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (em anexo) e passaram por anamnese (em anexo) antes de serem incluídas no estudo. Além disso, todas as voluntárias realizaram dosagem de perfil

hormonal para estrogênio, progesterona, FSH e LH anteriormente ao início das coletas das amostras.

4.3 Isolamento e cultivo das células-tronco endometriais

O fluido menstrual foi coletado com auxílio de coletor menstrual no dia de maior fluxo da voluntária. A voluntária utilizou o coletor por ao menos 4 horas e, posteriormente, o conteúdo coletado foi transferido para um tubo contendo 20 mL de solução tampão fosfato salino 1X (*phosphate buffered saline* - PBS) (ThermoFisher Scientific®, Waltham, EUA) acrescida de 4% de antibiótico e antimicótico (penicillin*/ streptomycin/ amphotericin B* - PSA) (ThermoFisher Scientific®, Waltham, EUA). O conteúdo coletado foi armazenado a 4°C por um período máximo de 8 horas até o processamento da amostra.

A amostra coletada foi centrifugada a 500xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em PBS 1X acrescido de 4% de PSA. Esse processo foi repetido duas vezes com a finalidade de lavar e concentrar a amostra coletada. Ao final da segunda lavagem, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em meio de cultivo IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium)* (ThermoFisher Scientific®, Waltham, EUA) acrescido de 20% de soro fetal bovino (SFB) (ThermoFisher Scientific®, Waltham, EUA) e 2% de PSA. As células foram colocadas em garrafas de cultivo de 25 cm^2 (Corning Inc, Nova York, EUA) e mantidas em incubadora vertical de CO_2 (ThermoFisher Scientific®, Waltham, EUA) a 37ºC e 6% de CO_2 em ambiente umidificado por 72 horas. Após esse período o meio de cultivo IMDM acrescido de 10% SFB e 1% de PSA foi renovado a cada 48 horas, nas mesmas condições ambientais, até as células atingirem confluência de 80 a 85%. As células foram congeladas em nitrogênio líquido a -196 ºC.

As amostras para estimativa das variações biológicas e reprodutibilidade dos resultados consistiu em amostras de fluido menstrual coletadas uma vez ao mês por 3 meses consecutivos, sendo realizadas, portanto, 3 repetições biológicas dos ensaios.

4.4 Diferenciação Celular

As CTEs foram induzidas à diferenciação celular *in vitro* adipogênica, condrogênica e osteogênica em passagem 1 (P1), utilizando o kit de diferenciação StemPro® (ThermoFisher Scientific®, Waltham, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. As amostras controle, não induzidas, foram mantidas em cultivo, sob as mesmas condições ambientais, durante todo o ensaio.

4.4.1 Diferenciação Adipogênica

As células em cultivo foram desprendidas da garrafa com tripsina 0,25% (ThermoFisher Scientific®, Waltham, EUA), contadas e subcultivadas a $1x10^4$ células/cm^2 em uma placa de 12 poços com meio de cultivo IMDM suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA. As placas foram incubadas a 37ºC e 6% de CO_2 em ambiente umidificado por 4 dias, com trocas de meio, feitas a cada 2 dias. O meio foi então substituído pelo meio de diferenciação adipogênica e as células foram mantidas em cultivo por mais 21 dias, com troca de meio a cada 4 dias. A diferenciação adipogênica foi avaliada no 22º dia por coloração com Oil Red O (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), a fim de identificar depósitos lipídicos. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas com PBS 1X, e coradas com Oil Red O 0,16% por 20 minutos. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência.

4.4.2 Diferenciação Osteogênica

As células em cultivo foram desprendidas da garrafa com tripsina 0,25%, contadas e subcultivadas a $5x10^3$ células/ cm^2 em uma placa de 12 poços, com meio de cultivo IMDM suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA. As placas foram incubadas a 37ºC e 6% de CO_2 em ambiente umidificado por 4 dias, com trocas de meio, feitas a cada 2 dias. O meio foi então substituído pelo meio de diferenciação osteogênico e as células foram mantidas em cultivo por mais 21 dias, com troca de meio a cada 4 dias. A diferenciação osteogênica foi avaliada no 22º dia pela coloração com Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), a fim de identificar

depósitos de cálcio. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas com PBS 1X e coradas com Alizarin Red S 2% (pH 4,2) por 3 minutos. As imagens foram capturadas em microscópio de luz.

4.4.3 Diferenciação Condrogênica

As células em cultivo foram desprendidas da garrafa com tripsina 0,25%, contadas e subcultivadas como micromassas de $8x10^5$ células/cm^2 em uma placa de 12 poços com meio de cultivo IMDM suplementado com 10% SFB e 1% PSA. As placas foram incubadas a 37ºC e 6% de CO_2 em ambiente umidificado por 2 horas. O meio foi então substituído pelo meio de diferenciação condrogênica e as células foram mantidas em cultivo por 21 dias, com troca do meio a cada 3 dias. A diferenciação condrogênica foi avaliada no 22º dia pela coloração com Azul de Toluidina (ACS Científica, São Paulo, Brasil), a fim de identificar condrócitos. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 minutos, lavadas com PBS 1X e coradas com Azul de Toluidina 1% preparado em HCl 0,1 N durante 30 minutos. Os poços foram lavados 3 vezes com HCl 0,1 N e, em seguida, foi adicionada água destilada para neutralizar a acidez. As imagens foram capturadas em microscópio de luz.

4.5 Ensaio de Citometria de Fluxo

As células derivadas de fluido menstrual, em P1, foram avaliadas por citometria de fluxo através da expressão de moléculas de superfície celular, CD105 (anti-human: PE; eBioscience®, San Diego, EUA) CD146 (anti-human: FITC; Biolegend, Califórnia, EUA), CD34 (anti-human: APC; Biolegend, Califórnia, EUA) e CD45 (anti-human: PerCP-Cy5.5; eBioscience®, San Diego, EUA).

As células foram desprendidas da garrafa de cultivo com tripsina 0,25% e separadas na concentração de $1x10^6$ células/mL para cada marcador, realizado em duplicata. As células foram incubadas em 50 µL de solução de PBS 1X acrescido de 1% de albumina de soro bovino (*bovine serum albumin* – BSA) (Gibco, Paisley, UK) por 20 minutos a 4ºC no escuro. A seguir, as células foram lavadas com PBS 1X acrescido de EDTA 2mM e BSA 0,5% e incubadas com 50 µL de anticorpo

correspondente por 1 hora no escuro a 4ºC, na diluição recomendada pelo fabricante. As células foram novamente lavadas com PBS 1X acrescido de EDTA 2mM e BSA 0,5% e ressuspensas em 400 µL de PBS 1X para leitura em um citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (Becton Dickinson Biosciences, New Jersey, EUA), usando o software CellQuest® (Becton Dickinson Biosciences, New Jersey, EUA), utilizando os filtros FL1, FL2, FL3 e FL4 e obtendo 20.000 eventos por amostra testada. As células não marcadas foram utilizadas como controle.

4.6 Subestudo I

4.6.1 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído das CTEs, em P1, utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha).

A amostra, com $1x10^6$ células, foi solubilizada em 350 µL de Tampão RLT para rompimento das células e o lisado foi homogeneizado durante 30 segundos em agitador vortex (Labor Import, São Paulo, Brasil). Foi adicionado 350 µL de etanol 70% ao lisado e a solução homogeneizada com pipeta. Toda a amostra (700 µL) foi transferida para uma coluna de centrifugação acoplada à um microtubo de coleta de 2 mL, centrifugada durante 15 segundos a 8000 rpm e o conteúdo recolhido descartado. Então, foi adicionado 700 µL de tampão RW1 na coluna, para lavagem da membrana, esta foi centrifugada durante 15 segundos a 8000 rpm e o conteúdo recolhido descartado. Após a primeira lavagem, foi adicionado 500 µL de tampão RPE na coluna, para segunda lavagem da membrana, esta foi centrifugada durante 15 segundos a 8000 rpm e o conteúdo recolhido descartado. A terceira lavagem da coluna foi feita adicionando novamente 500 µL de tampão RPE e esta foi centrifugada durante 2 minutos a 8000 rpm e o conteúdo recolhido descartado.

A coluna foi colocada em um novo microtubo de coleta de 2 mL e centrifugada a 14000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente, a coluna foi acoplada a um novo microtubo de coleta de 1,5 mL, adicionado 20 µL de água livre de RNase diretamente na membrana da coluna e centrifugada durante 1 minuto a 8000 rpm para eluição do RNA. O RNA foi armazenado a -80ºC para posterior realização da reação de RT-PCR.

Todas as soluções e todo o procedimento foram mantidos à temperatura ambiente.

4.6.2 Quantificação de RNA

Após extração do RNA total, as amostras foram quantificadas por leitura em 260nm (RNA), 280nm (proteína) e 230nm (etanol) em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific®, Waltham, EUA).

4.6.3 Desenho dos primers

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a reação de amplificação foram desenhados a partir de pesquisas em banco de dados de sequências e de dados já publicados. Foi utilizada a base de dados pública online Genbank BLAST. Os *primers* foram desenhados com o auxílio do software Primer3Plus. Os *primers* utilizados foram: GAPDH, Wnt3a, Wnt7a e β-Catenina (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados

Gene (GenBank)	Sequência
GAPDH (NM_002046)	**F:** TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT **R:** ACCAAATCCGTTGACTCCGACCTT
Wnt3a (NM_033131.4)	**F:** CTCCCTGGAGCTAGTGTCT **R:** GGCTGGACCTCTCTTCCTA
Wnt7a (NM_004625.4)	**F:** ACAACACCCACCAGTACGC **R:** CACGGAAACACACAGACAC
β-catenina (NM_015373.4)	**F:** GGAAGTCGGCATCTCTCTC **R:** GTTGTTGTGGAAGGCTGGT

4.6.4 RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase a Partir de Transcrição Reversa)

Uma quantidade de 500 ng de RNA total foi adicionada a um microtubo e adicionado 1 µL de *primer* Oligo $(dT)_{15}$ (Promega, Wisconsin, EUA) e quantidade de

água livre de RNase (Promega, Wisconsin, EUA) até completar um volume de 5 µL. A amostra foi incubada a 70ºC por 5 minutos e depois a 4ºC por 5 minutos.

Posteriormente à incubação, foi adicionada à amostra 15 µL da seguinte mistura: 1 µL de $dNTP_s$ mix (10mM) (Fermentas, Canadá, EUA), 2,4 µL de $MgCl_2$ (25mM) (Fermentas, Canadá, EUA), 0,5 µL de Recombinant RNasin® Ribonuclease (Promega, Wisconsin, EUA), 1 µL da enzima transcriptase reversa ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Wisconsin, EUA), 4 µL de tampão da enzima (5X) (Promega, Wisconsin, EUA) e 6,1 µL de água livre de RNase. O equipamento utilizado para a realização da reação de transcriptase reversa (RT) foi o termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). O programa para obtenção do cDNA (DNA complementar) foi um ciclo de 25ºC por 5 minutos, 42ºC por 60 minutos, 70ºC por 10 minutos e 4ºC por tempo infinito (até as amostras serem retiradas do aparelho). O cDNA formado foi armazenado a -20ºC.

4.6.5 PCR em Tempo Real

A reação de PCR em Tempo Real foi realizada utilizando SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biossystems, Waltham, EUA), incluindo AmpliTaq-GOLD polymerase em um aparelho ABI PRISM 7500 Real Time PCR System (Applied Biossystems, Waltham, EUA). Para cada reação, 0,5 µg de cDNA foi adicionado a 5 µl de SYBR® Green, 0,5 µl do primer sense (0,5µM, concentração final) (Exxtend Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 0,5 µl do primer anti-sense (0,5µM, concentração final) (Exxtend Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e 3,5 µl de água livre de RNase. Todas as reações foram feitas em triplicata. O ciclo das reações consistiu de: desnaturação a 95ºC por 10 minutos e 40 ciclos de 95ºC por 15 segundos (etapa de desnaturação), 55-60ºC por 1 minuto (etapa de anelamento e extensão) e 72ºC por 30 segundos.

4.6.6 Ensaio de Citometria de Fluxo

As células derivadas de fluido menstrual, em P1, foram avaliadas por citometria de fluxo através da expressão de componentes da via de sinalização Wnt, Wnt3a (anti-human; R&D Systems, Minnesota, EUA), Wnt7a (anti-human; R&D

Systems, Minnesota, EUA), β-Catenina (anti-human; R&D Systems, Minnesota, EUA) E anti-IgG Alexa® Flúor 488 (R&D Systems, Minnesota, EUA).

As células foram desprendidas da garrafa de cultivo com tripsina 0,25% e separadas na concentração de $1x10^6$ células/mL para cada marcador, realizado em duplicata. As células foram incubadas em 50 µL de solução de PBS 1X acrescido de 1% de albumina de soro bovino (*bovine serum albumin* – BSA) (Gibco, Paisley, UK) por 20 minutos a 4ºC no escuro. A seguir, as células foram lavadas com PBS 1X acrescido de EDTA 2mM e BSA 0,5% e incubadas com 50 µL de anticorpo primário ou anticorpo secundário correspondente por 1 hora no escuro a 4ºC, na diluição recomendada pelo fabricante. As células foram novamente lavadas com PBS 1X acrescido de EDTA 2mM e BSA 0,5% e ressuspensas em 400 µL de PBS 1X para leitura em um citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (Becton Dickinson Biosciences, New Jersey, EUA), usando o software CellQuest® (Becton Dickinson Biosciences, New Jersey, EUA), utilizando o filtro FL1 e obtendo 20.000 eventos por amostra testada. As células não marcadas foram utilizadas como controle.

4.7 Subestudo II

4.7.1 Metabolômica

As CTEs, em P1, foram congeladas a -20ºC em alíquotas de 50 µL com 50.000 células/alíquota até o momento da extração de metabólitos. O meio de cultivo condicionado dessas mesmas células foi obtido através de centrifugação a 500xg por 5 minutos e filtração do sobrenadante em filtro de poro 0,2 µm. O meio de cultivo também foi congelado a -20ºC em alíquotas de 50 µL até o momento da extração de metabólitos.

Para a extração de metabólitos das CTEs e do meio de cultivo condicionado (secretôma), foi realizado o método de *Bligh-Dyer*. A partir de 50 µL de meio de cultivo, retirado de garrafas de cultivo com 80-85% de confluência, ou 50 µL contendo $0,05x10^6$ células em água ultrapura, foram adicionados 50 µL de água ultrapura, 125 µL de clorofórmio (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil) e 250 µL de metanol (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil) em um microtubo de 1,5 mL. A mistura foi homogeneizada em agitador vórtex por 30

segundos. Em seguida foram adicionados 100 µL de água ultrapura e 125 µL de clorofórmio para separação das fases polar e apolar. As amostras foram submetidas à centrifugação a 500xg por 5 minutos. Por fim, aproximadamente 200 µL da fase orgânica superior, contendo os metabólitos, foram transferidos para um novo microtubo. Os tubos foram mantidos abertos para evaporação do solvente. As amostras de "branco" (sem células) também foram preparadas com os mesmos solventes utilizados na extração dos metabólitos, para verificar possíveis impurezas, contaminações e para utilizá-los como linhas de base para as curvas de calibração de cada analito analisado.

A análise dos metabólitos foi realizada utilizando espectrometria de massas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight*) em equipamento Autoflex™ Speed (Bruker Daltonics, Massachusetts, EUA), equipado com um laser SmartBeam™ II 355 nm, no modo reflector, em modo de ionização positiva, massa de supressão de matriz de 350 Daltons e calibração externa utilizando mix de PEGs, visando a formação de um calibrante na faixa de 400-1500 Daltons. Foram preparadas amostras individuais de PEGs:Matriz:Cationizante na proporção 5:15:5. Foi preparado um mix de PEGs 400, 600 e 2.000 na proporção 1:1:3. Para o preparo da placa, foi aplicado 1 µL de solução 10 mg/mL de ácido α-Cyano-4-hydroxycinnamic em água e acetonitrila (1:1). Após secagem, foi aplicado 0,5 µL de amostra de CTEs ou de meio de cultivo. A título de manter as análises mais confiáveis, foram realizadas calibrações entre as leituras, assim como análises de brancos. Os parâmetros utilizados no equipamento foram: tensão da fonte IS1 19.2kV, tensão da fonte IS2 16.85kV, tensão do reflector 1 21 kV, tensão do reflector 2 9.75 kV, tensão de lentes 7.1kV e pulso da extração de íons de 250ns. Foram realizados disparos de laser aleatórios, sendo que as amostras foram ionizadas por 3.000 disparos, que foram somados e processados pelo algoritmo de detecção de pico tipo centróide do programa FlexControl 3.3 (Bruker Daltonics, Massachusetts, EUA), gerando o espectro bruto de cada amostra.

4.8 Análise estatística

A análise estatística para maioria das variáveis, com exceção dos dados da análise metabolômica, foi realizada utilizando o *software* SPSS 28.0 (IBM, Nova

Iorque, EUA). Foi realizada a análise exploratória de dados por meio de estatísticas descritivas (média ± desvio padrão) e construção de gráficos através dos *softwares* SPSS 18.0 e GraphPad Prism® 6.0. Primeiramente as variáveis contínuas foram testadas quanto à sua normalidade com o teste *Shapiro-Wilk* e quando não apresentaram distribuição normal foram padronizadas por *z-escore*. As variáveis contínuas foram comparadas entre os grupos utilizando o teste GLM Independente Univariado, com *post hoc* Bonferroni. Foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

Em relação às análises metabolômicas, os dados foram analisados pelo programa MetaboAnalyst 5.0. Os valores de intensidade foram normalizados por Log2. Primeiramente uma análise de correlação de Pearson foi feita e os íons com maior coeficiente de correlação foram utilizados para formar razões de íons, as quais foram utilizadas nas análises seguintes. Posteriormente foi feita uma análise multivariada por meio da análise de componentes principais (*principal component analysis* - PCA) e análise discriminante dos quadrados mínimos (*partial least square discrimnant analysis* - PLS-DA). A partir destes dados, o componente com melhor predição para a PLS-DA apresentou uma lista de valores de massas correspondentes às variáveis de maior importância para a projeção (*Variable Importance in Projection* - VIP) do modelo. Os metabólitos encontrados pela análise estatística nas amostras de "branco" foram subtraídos daqueles encontrados nas amostras de CTEs ou meio de cultivo (secretôma). A atribuição dos íons aos metabólitos, a partir dos valores de massas, foi realizada através do banco de dados HMDB 5.0 (*Human Metabolome Database*) (www.hmdb.ca) e Lipid Maps (www.lipidmaps.org). Para a atribuição, apenas moléculas contendo hidrogênio $[M+H]^+$, sódio $[M+Na]^+$ e potássio $[M+K]^+$ como adutos foram consideradas. Foi aceito uma tolerância de massa máxima de m/z +/- 0.05 Daltons ou um erro de massa máximo de 50 ppm. Para vários acertos associados a um m/z, foram aceitos aqueles que apresentaram o menor erro de massa. Metabólitos referentes a drogas foram descartados.

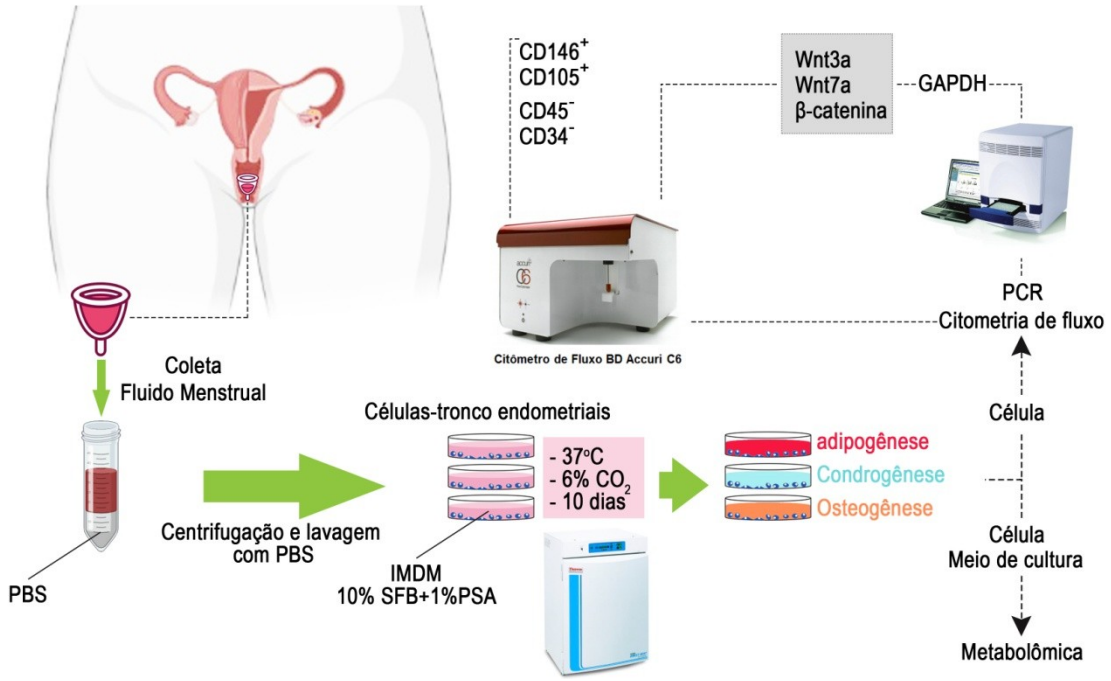

Figura 3. Fluxograma do estudo.

5 RESULTADOS

5.1 Descrição dos grupos de estudo

As amostras de fluido menstrual incluídas nesse estudo foram coletadas através de coletor menstrual e foram provenientes de mulheres saudáveis e em idade reprodutiva que aceitaram participar como voluntárias do estudo. Dentre as participantes, foi possível recrutar 30 mulheres, sendo 2 voluntárias excluídas da análise por resultados de perfil hormonal alterados, 5 voluntárias excluídas por insuficiência de células viáveis na amostra, 4 voluntárias excluídas por interrupção do uso de CHO anteriormente à finalização das coletas das amostras, 1 voluntária excluída por mudança de cidade anteriormente à finalização das coletas das amostras e 1 voluntária excluída por não adaptação ao uso do coletor menstrual anteriormente à finalização das coletas das amostras. O total de participantes no estudo foi de 10 mulheres para o grupo CT e 7 mulheres para o grupo CHO.

As voluntárias pertencentes ao grupo CT foram aquelas que não faziam uso de qualquer método contraceptivo hormonal. Possuíam média de 28,4 anos, eram todas não fumantes e sem filhos. O grupo possuía uma média de 26,3 dias de ciclo menstrual (Tabela 2).

As voluntárias pertencentes ao grupo CHO foram aquelas que faziam uso de CHO por ao menos 1 ano. Possuíam média de 25,1 anos, eram todas não fumantes e sem filhos. O grupo possuía uma média de 26,6 dias de ciclo menstrual. Em relação ao tempo de uso de CHO, a média foi de 6 anos (Tabela 2) e todas as voluntárias utilizavam CHO combinado de progesterona + estradiol.

Tabela 2. **Características gerais das voluntárias ao estudo**. A tabela descreve as principais características das voluntárias incluídas no estudo, comparando os grupos CT e CHO. CT, Controle; CHO, Contraceptivo Hormonal Oral

	Grupo	Idade	Fumante	Ciclo Menstrual (Dias)	Filhos	Tempo de Uso CHO (Anos)
Média	**CT**	28,4	0	26,3	0	0
	CHO	25,1	0	26,6	0	6
Mínimo	**CT**	22	0	24	0	0
	CHO	21	0	23	0	1,5
Máximo	**CT**	35	0	28	0	0
	CHO	30	0	28	0	10

5.2 Caracterização das células-tronco endometriais

A caracterização das CTEs foi realizada em 3 repetições biológicas. Levando em consideração a unidade amostral como cada menstruação mensal, um total de 51 amostras foram coletadas.

Na passagem 0 (P0), nos primeiros dois dias de cultivo, observou-se ao microscópio de luz que o isolamento celular de fluido menstrual proporcionou uma cultura heterogênea, composta por células arredondadas não aderentes e muitas hemácias. A partir do terceiro dia, a população celular era mais homogênea, com predomínio de células aderentes ao plástico, apresentando morfologia fibroblastóide fusiforme (Figura 4A) e organizando-se em pequenas unidades formadoras de colônias (Figura 4B, seta). A renovação do meio de cultivo a cada 48 horas levou à retirada de células não aderentes e hemácias, além de restos celulares que interferem no desenvolvimento ideal das células.

À medida que as células se aproximavam da confluência (ocupação da garrafa de cultivo durante sua proliferação), em média 80 a 85%, elas assumiram uma população celular homogênea com um fenótipo não hematopoiético característico. As células mantiveram capacidade de proliferação estável ao longo do período de cultivo e a morfologia foi conservada em passagens posteriores, sem sinais de senescência ou de diferenciação celular. Através da visualização de 80 a 85% de confluência do cultivo celular, em média após 10 dias de cultivo, as células foram tripsinizadas e replicadas em uma nova subcultura ou congeladas em nitrogênio líquido a -196 ºC.

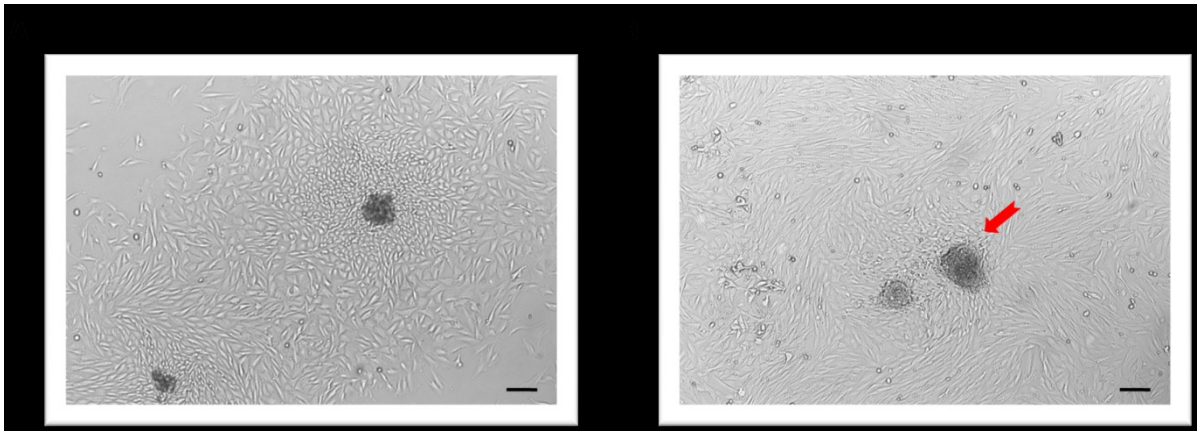

Figura 4. Morfologia das CTEs em P0. As células foram isoladas a partir de fluido menstrual e mantidas em cultivo, em média, por 10 dias. (A) Fenótipo das CTEs em crescimento. (B) Colônia bem formada. As imagens são representativas para todas as amostras coletadas e para as 3 repetições biológicas. Ampliação 100X, escala 200 µm.

Foi realizado ensaio de citometria de fluxo para avaliação dos marcadores de superfície celular expressos pelas CTEs derivadas de fluido menstrual em P1. O ensaio mostrou alta expressão dos marcadores de superfície mesenquimais, CD105 e CD146, e baixa expressão dos marcadores de superfície hematopoiéticos, CD45 e CD34 (Tabela 3 e Figura 5).

O conjunto de marcadores utilizados permitiu inferir que a população de células isoladas e cultivadas era homogênea e claramente distinta da linhagem hematopoiética (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Caracterização das CTEs por Citometria de Fluxo. Marcadores de células mesenquimais, CD146 e CD105 e marcadores de células hematopoiéticas, CD34 e CD45. Intensidade ≥90% representou alta expressão, enquanto ≤20% representou baixa ou nenhuma expressão. CT, Controle; CHO, Contraceptivo Hormonal Oral

ID	Grupo	$CD146^+$ (%)	$CD105^+$ (%)	$CD45^-$ (%)	$CD34^-$ (%)
1	**CT**	92,4	98,0	26,7	1,6
2	**CT**	66,6	85,5	23,4	2,5
3	**CT**	68,8	93,5	14,4	2,7
4	**CT**	75,4	98,3	15,3	1,2
5	**CT**	82,0	91,9	15,9	1,3
6	**CT**	78,0	91,8	13,3	1,3
7	**CT**	74,4	95,0	6,7	0,8
8	**CT**	71,4	90,1	3,5	0,5
9	**CT**	79,7	90,1	23,0	1,8
10	**CT**	84,2	91,4	14,7	1,3
1	**CHO**	74,6	90,2	12,7	1,0
2	**CHO**	82,8	98,0	25,0	2,8
3	**CHO**	78,5	91,4	10,3	0,5
4	**CHO**	81,0	96,5	15,2	2,3
5	**CHO**	81,0	94,9	16,4	1,1
6	**CHO**	86,9	94,1	19,9	1,0
7	**CHO**	88,0	94,7	9,0	1,3

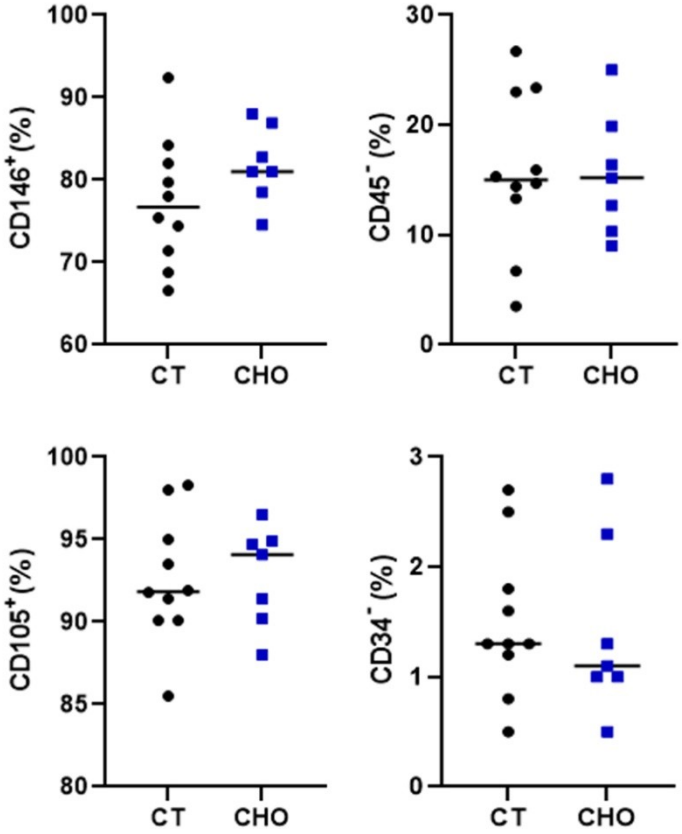

Figura 5. Expressão dos marcadores de superfície celular mesenquimais, CD105 e CD146, e hematopoiéticas, CD34 e CD45, nos grupos CT e CHO por Citometria de Fluxo. As células foram cultivadas e marcadas com anticorpos CD105, CD146, CD34 e CD45 para análise em Citômetro de fluxo. CT, Controle; CHO, Contraceptivo Hormonal Oral.

Tabela 4. Dados descritivos dos marcadores de células mesenquimais e hematopoiéticas. Média e valores mínimos e máximos dos marcadores de células mesenquimais, CD146 e CD105 e marcadores de células hematopoiéticas, CD34 e CD45. CT, Controle; CHO, Contraceptivo Hormonal Oral

	Grupo	$CD146^+$ (%)	$CD105^+$ (%)	$CD45^-$ (%)	$CD34^-$ (%)
Média	**CT**	77,30	92,60	15,70	1,51
	CHO	81,80	94,30	15,50	1,44
Mínimo	**CT**	66,60	85,50	3,53	0,55
	CHO	74,60	90,20	9,00	0,50
Máximo	**CT**	92,40	98,30	26,70	2,75
	CHO	88,00	98,00	25,00	2,81

As CTEs demonstraram potencial para se diferenciar em adipócitos, condroblastos e osteoblastos. A diferenciação convencional adipogênica, osteogênica e condrogênica foi induzida com meios de cultivo específicos e os

resultados foram demonstrados por coloração positiva com Oil Red O, Alizarin Red S e Azul de Toluidina, respectivamente.

Após 21 dias de indução adipogênica, a morfologia das CTEs foi modificada, revelando um acúmulo lipídico intracelular quando corados com Oil-Red-O. Após três semanas de estimulação, grandes inclusões lipídicas foram encontradas no citoplasma, indicando a capacidade adipogênica dessas células (Figura 6).

Quando as CTEs foram cultivadas em meio condrogênico durante 21 dias, as células apresentaram morfologia semelhante à dos condrócitos, evidenciada pela coloração com Azul de Toluidina (Figura 6).

As células cultivadas em meio osteogênico apresentaram morfologia semelhante a precipitados de cálcio, revelando uma matriz extracelular calcificada com depósitos minerais, confirmada por Alizarin Red S após 21 dias de indução osteogênica (Figura 6).

Os resultados mostraram que as CTEs foram capazes de se diferenciar nas três linhagens.

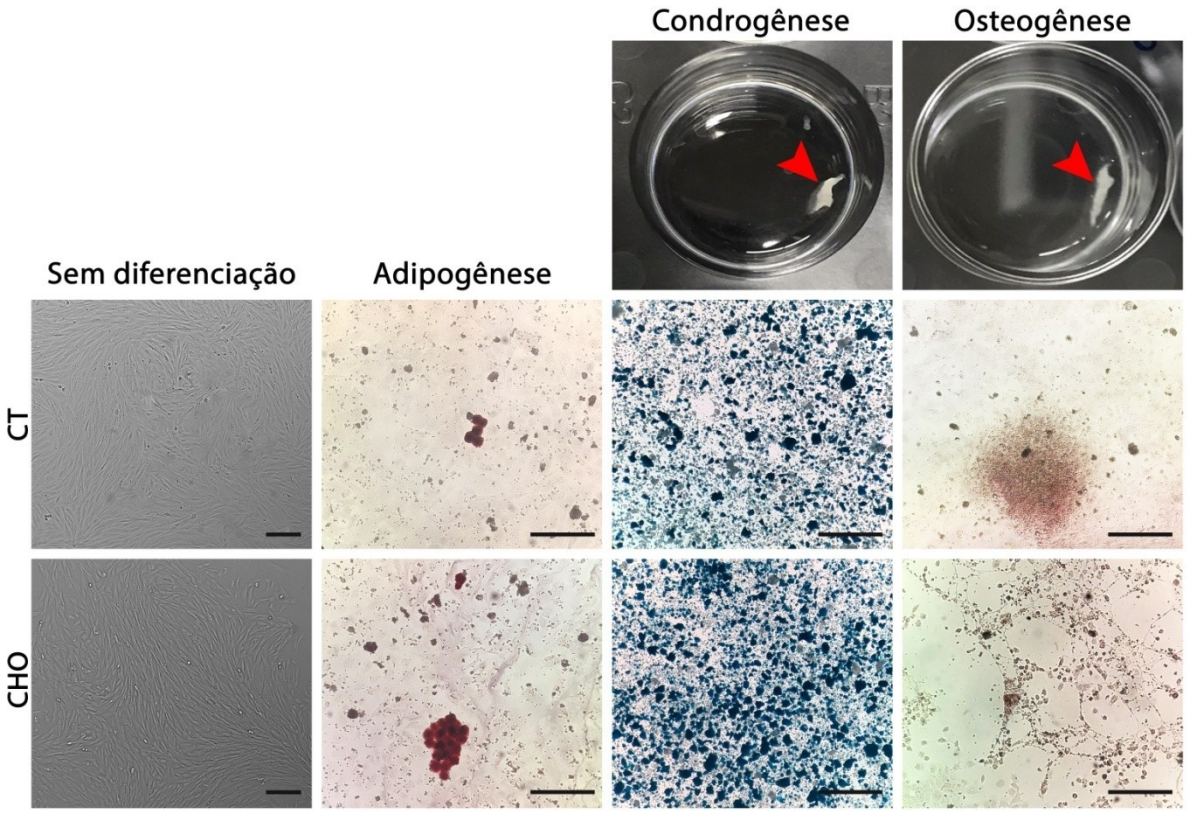

Figura 6. Evidência morfológica após 21 dias de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica de CTEs em P1. A diferenciação adipogênica foi avaliada pela presença de vesículas lipídicas coradas em vermelho escuro com Oil-Red-O. A diferenciação condrogênica foi demonstrada por coloração com Azul de Toluidina. A diferenciação osteogênica foi avaliada por nódulos

calcificados corados em vermelho claro com Alizarin Red S. As setas em vermelho indicam visualização da diferenciação condrogênica e osteogênica a olho nu. As imagens são representativas para todas as amostras coletadas e para as 3 repetições biológicas. Ampliação 100X e 400X, escala 200 µm. CT, Controle; CHO, Contraceptivo Hormonal Oral.

5.3 Subestudo I

5.3.1 Análise de expressão gênica

A análise de expressão gênica das CTEs foi realizada em 3 repetições biológicas. O estudo da expressão gênica dos genes de interesse Wnt3a, Wnt7a e β-catenina foi realizado por RT-PCR em Tempo Real a partir de cDNA obtido pela transcrição reversa de RNAm obtidos das CTEs.

Conforme apresentado na Figura 7, os resultados mostraram que o nível de expressão de Wnt3a, Wnt7a e β-catenina no grupo CHO foi significativamente menor do que no grupo CT.

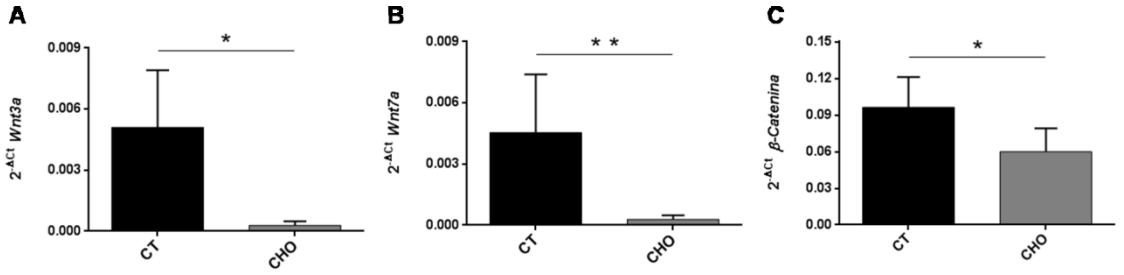

Figura 7. Expressão gênica por PCR em Tempo Real de componentes da via de sinalização Wnt, Wnt3a, Wnt7a e β-Catenina nos grupos CT e CHO. A figura mostra uma comparação entre os grupos da expressão gênica de (A) Wnt3a, (B) Wnt7a e (C) β-Catenina. O nível de expressão do gene foi normalizado pela expressão de GAPDH. Os dados de cada experimento foram obtidos em triplicata e são apresentados como média ± desvio padrão. *p<0,05 e **p<0,01. CT, Controle; CHO, Contraceptivo Hormonal Oral.

Podemos observar na Tabela 5 a descrição das variáveis analisadas por PCR em Tempo Real. Após análise estatística, foi possível observar diferença entre os grupos para todas as variáveis. Notou-se que o grupo CHO apresentou menor expressão gênica de Wnt3a (média±DP=0,0003±0,0001) quando comparado ao grupo CT (média±DP=0,0063±0,0058), com p<0,017, um tamanho de efeito de 0,326 e um poder observado de 71,2%. O mesmo foi observado para Wnt7a (média±DP=0,0002±0,0001) quando comparado ao grupo CT (média±DP=0,0051±0,0040), com p<0,007, um tamanho de efeito de 0,392 e um poder observado de 82,8% e para β-catenina (média±DP=0,0640±0,0272) quando

comparado ao grupo CT (média±DP=0,1072±0,0423), com $p<0,032$, um tamanho de efeito de 0,271 e um poder observado de 59,8%.

Tabela 5. Dados descritivos da expressão gênica de Wnt3a, Wnt7a e β-Catenina nos grupos CT e CHO. Os grupos foram comparados utilizando o teste GLM, para cada variável valores expressos em media±desvio padrão e intervalo de confiança de 95%. Além do valor de *p*, também foram incluídos os valores de tamanho de efeito (*Eta Square*) e poder observado. CT, Controle; CHO, Contraceptivo Hormonal Oral

Variável	CT (n=10)	CHO (n=7)	*p*	*Eta Square*	Poder
Wnt3a					
Média±DP	0,0063±0,0058[a]	0,0003±0,0001[b]	**0,017**	0,326	71,2%
IC (95%)	0,0017 – 0,0216	0,0000 – 0,0004			
Wnt7a					
Média±DP	0,0051±0,0040[a]	0,0002±0,0001[b]	**0,007**	0,392	82,8%
IC (95%)	0,0013 – 0,0140	0,0000 – 0,0004			
β-Catenina					
Média±DP	0,1072±0,0423[a]	0,0640±0,0272[b]	**0,032**	0,271	59,8
IC (95%)	0,0595 – 0,1819	0,0395 – 0,1146			

[a,b] representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos no teste *post hoc* de Bonferroni.

5.3.2 Análise de expressão proteica

A análise de expressão proteica das CTEs foi realizada em 3 repetições biológicas. O estudo da expressão proteica por citometria de fluxo mostrou que Wnt3a, Wnt7a e β-catenina foram expressos em níveis semelhantes nos grupos CT e CHO (Figura 8). Diferentemente da análise de expressão gênica, a expressão proteica não revelou diferenças significativas entre os grupos para nenhuma das variáveis após análise estatística (Tabela 6).

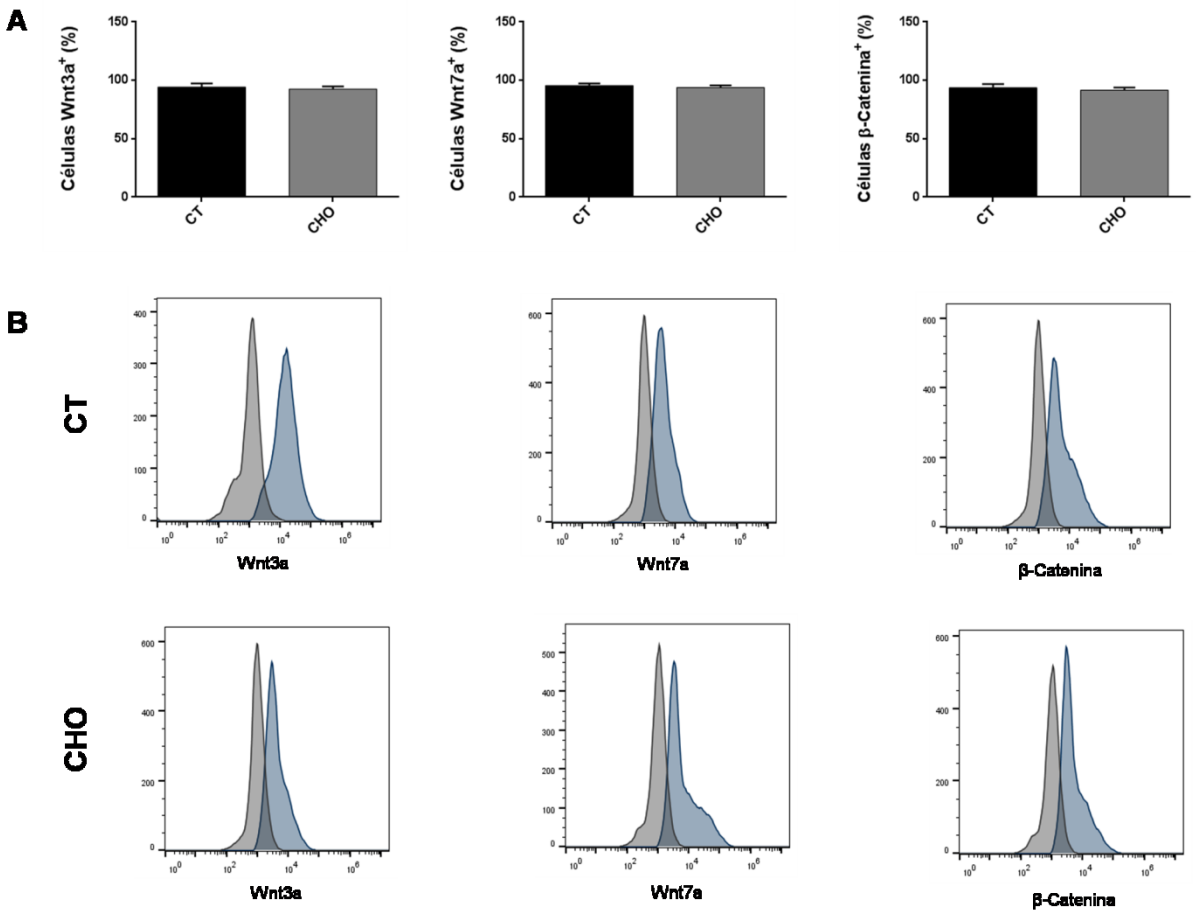

Figura 8. Expressão proteica de Wnt3a, Wnt7a e β-Catenina nos grupos CT e CHO por Citometria de Fluxo. (A) As células foram cultivadas e marcadas com anticorpos anti-Wnt3a, anti-Wn7a ou anti-β-Catenina para análise em Citômetro de Fluxo. (B) Os histogramas são representativos para todas as amostras coletadas e para as 3 repetições biológicas. Os picos cinzas indicam fluorescência obtida de células não marcadas. CT, Controle; CHO, Contraceptivo Hormonal Oral.

Tabela 6. Dados descritivos da expressão proteica de Wnt3a, Wnt7a e β-Catenina nos grupos de estudo. Os grupos foram comparados utilizando o teste GLM, para cada variável valores expressos em media±desvio padrão e intervalo de confiança de 95%. Além do valor de *p*, também foram incluídos os valores de tamanho de efeito (*Eta Square*) e poder observado. CT, Controle; CHO, Contraceptivo Hormonal Oral

Variável	CT (n=10)	CHO (n=7)	*P*	*Eta Square*	Poder
Wnt3a Média±DP IC (95%)	94,160±3,2277 87,1 - 98,4	92,548±2,0969 89,0 - 95,9	0,266	0,082	19,1%
Wnt7a Média±DP IC (95%)	95,487±1,8359 92,4 - 98,4	93,819±1,8843 90,7 - 96,6	0,088	0,181	40%
β-Catenina Média±DP IC (95%)	93,560±3,2271 86,4 - 98,0	91,610±2,1769 88,5 - 94,5	0,186	0,114	25,5%

5.4 Subestudo II

5.4.1 Metabolômica

Na análise de espectrometria de massas MALDI-TOF foram avaliados os metabólitos presentes nas CTEs e aqueles secretados no meio de cultivo (secretôma) durante o cultivo *in vitro* dessas células, em P1. Para a normalização dos dados, foram utilizadas amostras de “branco” (sem células). Os conjuntos de dados foram submetidos à análise estatística multivariada para identificar diferenças entre os grupos. Para avaliar os efeitos do CHO na expressão de metabólitos foi realizada a análise discriminante dos quadrados mínimos (PLS-DA), a fim de separar os metabólitos de acordo com os grupos de estudo. Os resultados demonstraram, nas duas análises, celular e do secretôma, que o grupo CT distinguiu-se claramente do grupo CHO (Figura 9).

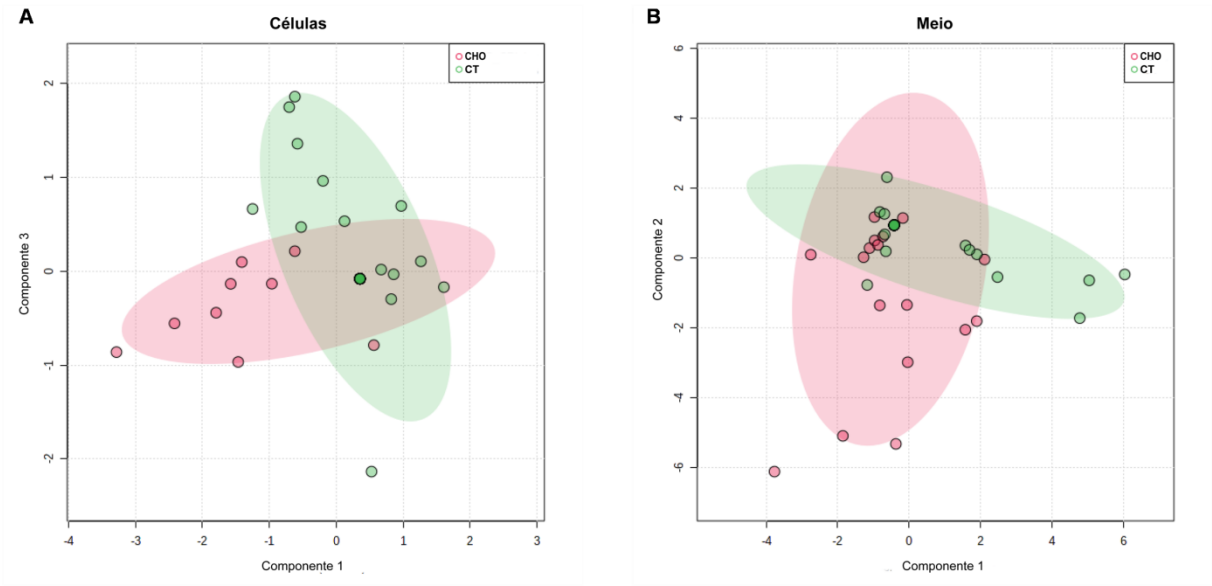

Figura 9. Gráfico da análise discriminante dos quadrados mínimos da metabolômica de células e de meio de cultivo dos grupos CT e CHO. (A) *Score plot* de separação entre os grupos CT e CHO na análise celular (B) *Score plot* de separação entre os grupos CT e CHO na análise de meio de cultivo (secretôma). CT, Controle; CHO, Contraceptivo Hormonal Oral.

O componente com melhor predição para PLS-DA apresentou uma lista de valores de massas correspondentes às variáveis de maior importância para a projeção (*Variables Importance in Projection* - VIPs) do modelo em cada grupo de estudo (Figura 10). A partir dessa análise foram atribuídos metabólitos potenciais de CTEs e de seu secretôma, diferencialmente representados em cada grupo de estudo. Dos 15 VIPs encontrados nas CTEs, 4 estavam hiperrepresentados no grupo CHO em relação ao grupo CT (Figura 10A). Já no meio de cultivo (secretôma), dos 15 VIPs encontrados, 11 estavam hiperrepresentados no grupo CHO em relação ao grupo CT (Figura 10B). A atribuição dos íons aos metabólitos, a partir dos valores de massas, foi realizada através do banco de dados HMDB e Lipid Maps. No entanto, nem todos os sinais diferentemente hiperrepresentados foram atribuídos como potenciais metabólitos, pois não contavam nos bancos de dados ou não eram atribuídos em humanos. Os metabólitos que foram atribuídos estão apresentados na Tabela 7.

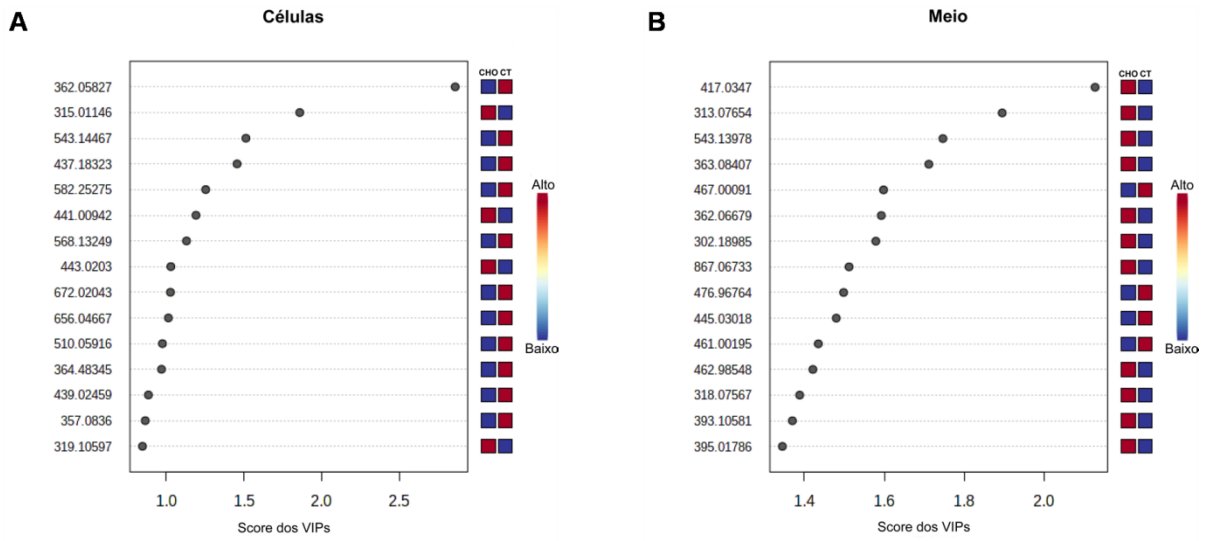

Figura 10. ***Score* dos VIPs** das (A) CTEs e do (B) meio de cultivo (secretôma), indicando a intensidade dos íons em cada grupo. As caixas coloridas indicam as concentrações relativas do metabólito correspondente em cada grupo. Quadrados em vermelho representam sinais hiperrepresentados e quadrados em azul representam sinais hiporepresentados. O eixo x apresenta os valores dos VIPs. CT, Controle; CHO, Contraceptivo Hormonal Oral.

Tabela 7. Metabólitos encontrados nas CTEs e em seu meio de cultivo (secretôma)

Célula	Meio (secretoma)
4-O-beta-Laminaribiosil-D-glicose	**Ácido 3,4,5-trihidroxi-6-({7-oxo-7H-furo[3,2-g]cromen-4-il}oxi) oxano-2-carboxílico**
Tirosil-valina	**Ácido L-N-(1H-Indol-3-ilacetil) aspártico**
Gentianose	**Resveratrol 4'-(2-galoilglicosídeo)**
N-Palmitoil arginina	**Trans-isoeugenol-O-glucuronídeo**
N-Palmitoil alanina	**Glucuronídeo de 6-hidroxi-5-metoxiindol (6-H-5 MIG)**
Sulfato de alopregnanolona	**Nonanoilcarnitina**
Sulfato de pregnanolona	**Ácido 4-hidroxi-5-(fenil)-valérico-O-glicuronídeo**
Hidroxistilbamidina	**Acetato de estrona**
Urolitina A-8-O-glucuronídeo	**Etinilestriol**
Tirosil-histidina	**Levonorgestrel**
Asparaginil-triptofano	**Ácido docosahexaenóico (DHA)**
Histidiltirosina	
Fosfato de diidroxiacetona (DHAP)	

Os metabólitos em negrito representam hiperrepresentação no grupo CHO.

6 DISCUSSÃO

Em 2006, um conjunto de critérios foi acordado pela *International Society for Cell Therapy* para o estudo e identificação de CTMs. Primeiro, as CTMs devem aderir ao plástico quando mantidas em condições de cultivo padrão. Em segundo lugar, as CTMs devem expressar marcadores de superfície celular. Terceiro, as CTMs devem ser capazes de se diferenciar em adipócitos, osteoblastos e condroblastos *in vitro* (16, 32). As análises de caracterização das células utilizadas neste estudo confirmaram essas características.

Estudos já demonstraram que as CTs isoladas de fluido menstrual apresentam propriedades de CTMs (34, 70). Em resposta aos hormônios esteroides sexuais femininos produzidos pelos ovários, estrogênio e progesterona (71), o endométrio humano apresenta mudanças cíclicas e rápidas para proliferação e diferenciação. As células do estroma endometrial são enriquecidas com CTs e estão localizadas em regiões perivasculares nas camadas funcional e basal (20, 72). Essas células são clonogênicas, possuem ampla capacidade de diferenciação e exibem propriedades e fenótipo semelhantes à CTMs (20). Xu *et al*. demonstraram que durante a fase menstrual, as CTEs exibiram maior capacidade de autorrenovação e proliferação. Esses achados apóiam a ideia de que as CTEs são responsáveis pela regeneração endometrial que se inicia na menstruação e continua durante a fase proliferativa (20, 73). Desta forma, a descamação e a reparação das camadas funcionais do endométrio ocorrem simultaneamente durante a menstruação. Esse processo regenerativo rápido indica a presença de sinais para ativação de CTs durante a menstruação (23, 74), já que normalmente elas permanecem quiescentes e indiferenciadas situadas dentro do nicho (18). As CTEs são compostas por populações heterogêneas, mostrando marcadores de células mesenquimais (CD90, CD105 e CD146) (75, 76) e não mostrando marcadores de células hematopoiéticas (CD34 e CD45). Além disso, já foi confirmado que as CTEs possuem a capacidade de formar unidades de colônias quando cultivadas *in vitro* (22, 47, 77).

A cada ciclo menstrual, em preparo para a implantação de um embrião (78), o endométrio passa por um processo de proliferação, diferenciação, degeneração e regeneração (50, 64). Os estrogênios, produzidos em quantidades crescentes

durante a primeira metade do ciclo menstrual regular, a fase de proliferação, induzem o crescimento da camada funcional do endométrio. A progesterona, mais produzida na segunda metade do ciclo, a fase lútea (secretora), antagoniza os efeitos estrogênicos e induz a diferenciação. A diferenciação é caracterizada pela indução da atividade secretora das glândulas, atração de células *natural killer* e início da transformação das células do estroma endometrial em células deciduais (início da decidualização). Este processo endometrial em humanos é um passo crucial para a implantação, invasão de trofoblastos e decidualização completa do estroma uterino (19, 79).

Mudanças acentuadas nos níveis de expressão de vários genes no endométrio humano durante a janela de implantação (níveis de progesterona circulantes de pico), em comparação com as etapas do ciclo com baixa progesterona ou alto estrogênio sugerem controle hormonal desses genes (7). O estrogênio e a progesterona ligam-se aos seus respectivos receptores e regulam diretamente a transcrição de vários genes envolvidos na fisiologia endometrial (78). Muitas proteínas são responsáveis pelo desenvolvimento e regeneração do endométrio, das quais proteínas Wnt, c-kit (CD117), Oct-4, CD34/KLF4 e Musashi-1 são as mais bem classificadas (64, 80).

A sinalização Wnt desempenha um importante papel na expansão populacional e autorrenovação de CTs adultas em vários tecidos de mamíferos, incluindo o endométrio (23, 81). A identificação da relação entre a sinalização Wnt e vários fatores de transcrição associados à receptividade uterina pode indicar a regulação hormonal da sinalização Wnt no útero. A sinalização desta via é afetada pela regulação hormonal durante o ciclo menstrual e gravidez, além de estar associada a alterações estruturais e funcionais no endométrio durante os processos de pré-implantação e implantação (61). Portanto, nosso trabalho visou avaliar a expressão gênica e proteica de componentes da via de sinalização Wnt em CTEs provenientes de fluido menstrual.

A participação da sinalização Wnt/β-catenina como componente molecular no nicho de CTMs foi observada em camundongos e humanos (50). No endométrio, a sinalização Wnt/β-catenina está envolvida em vários processos de desenvolvimento e é modulada pelos hormônios. A sinalização Wnt/β-catenina tem uma função central na manutenção e controle dos compartimentos das CTs onde regula o

equilíbrio entre *stemness* (Wnt ativa) e diferenciação (Wnt inativa). Durante a fase proliferativa do ciclo menstrual, níveis aumentados de estrogênio induzem a sinalização Wnt/β-catenina para aumento da proliferação, enquanto durante a fase secretora, os níveis de progesterona inibem a sinalização Wnt/β-catenina, equilibrando a proliferação induzida por estrogênio e aumentando a diferenciação (19, 82, 83).

Vários estudos descreveram a expressão de ligantes Wnt que ativam a via canônica durante o desenvolvimento endometrial, incluindo Wnt3, Wnt7a e Wnt8b. Esses ligantes são glicoproteínas que exercem um papel correspondente na re-formação do endométrio durante o ciclo menstrual. Falhas de implantação e decidualização foram relatadas em camundongos nocaute para Wnt7a (62). Camundongos Wnt7a nocautes não formam glândulas endometriais e são inférteis (7). Tulac *et al*. demonstraram que os ligantes Wnt2, Wnt3, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a e Wnt8b se expressam ao longo de todo ciclo menstrual (63). Wang *et al*. demonstrou que Wnt4, Wnt5a, Wnt6 e Wnt7a foram regulados pelo estrogênio durante a fase proliferativa do ciclo menstrual, enquanto inibidores, como DKK1 e FOXO1, da sinalização Wnt/β-catenina foram regulados pela progesterona durante a fase secretora do ciclo menstrual (82). Wnt4 é crucial para o desenvolvimento sexo-específico do trato reprodutivo feminino (7). Este ligante é necessário para a iniciação do ducto Mulleriano, enquanto Wnt7a para diferenciação subsequente e Wnt5a para posterior crescimento do trato reprodutivo feminino (7, 63, 82).

Kiewisz *et al*. demonstraram que membros da via Wnt, incluindo Wnt4, Wnt5a, β-catenina e E-caderina, são expressos no epitélio luminal e glandular do endométrio de porcos durante o período de peri-implantação da gravidez e na fase lútea do ciclo estral. Além disso, Wnt5a e Wnt7a têm padrões de expressão diferentes durante o ciclo estral em comparação com a gravidez, sugerindo que esses membros da família Wnt são regulados hormonalmente (57, 58). Wnt4 e Wnt5 são expressos por fibroblastos estromais e Wnt7 por células epiteliais com sinalização parácrina e autócrina, controlando o destino celular e a diferenciação no útero (5). Uma alta expressão de Wnt5a foi detectada em miócitos uterinos. Infere-se que os miócitos uterinos são componentes ativados do microambiente das CTMs e a via de sinalização Wnt5a/β-catenina é uma importante via de sinalização para ativar as CTMs. Além disso, o ligante Wnt3a foi confirmado na participação da sinalização

de β-catenina na autorrenovação de CTMs (30, 64). Um estudo mostrou que o tratamento com Wnt3a em células do estroma endometrial aumentou significativamente a proliferação e migração celular (84). A aplicação exógena do ligante Wnt3a ao cultivo *in vitro* de células tem um efeito proliferativo na população de CTMs e resulta em autorrenovação e inibição da apoptose (57, 58).

Jeong *et al*. mostraram que a expressão adequada de β-catenina é vital para a função uterina normal (82, 85). A modulação da via Wnt/β-catenina demonstrou afetar a regeneração e o desenvolvimento do endométrio suíno (23, 86). A interação entre o estrogênio e seu receptor dissocia a β-catenina do complexo de destruição, que se estabiliza e se acumula no citoplasma, translocando-se para o núcleo para interagir com fatores de transcrição (62). A β-catenina foi identificada em células glandulares e estromais e foi altamente expressa durante as fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual (61, 63). Há uma expressão aumentada de β-catenina em CTs estromais em proliferação no endométrio pós-parto de camundongos (23, 81). Mohamed *et al*. demonstraram que no 5º dia após a fertilização, a via de sinalização Wnt/β-catenina foi ativada em regiões endometriais específicas nas proximidades de um blastocisto, indicando a comunicação cruzada entre o blastocisto e o endométrio. A sinalização do blastocisto para o endométrio ativa a via de sinalização Wnt/β-catenina no local da implantação e é um pré-requisito para a implantação adequada (87).

Para obter uma melhor compreensão da interação entre as CTEs e o meio hormonal, avaliamos a influência dos CHOs na via de sinalização Wnt. Um estudo mostrou que a administração de progesterona ou estrogênio sintéticos durante uma janela de tempo pós-natal precoce inibe a formação de glândulas endometriais no útero de camundongos (88). Mehdinejadiani *et al*. demonstraram que a expressão de RNAm de Wnt3 e Wnt7a foi significativamente diminuída na fase proliferativa do ciclo menstrual em um grupo de mulheres em tratamento com citrato de clomifeno, um agonista parcial do receptor de estrogênio, em comparação ao grupo controle, confirmando que a expressão desses ligantes Wnts foi afetada por hormônios sexuais. Além disso, o citrato de clomifeno também reduziu significativamente o RNAm de Wnt8b (62). Este achado está de acordo com dados anteriores que haviam relatado a redução das glândulas endometriais em mulheres que tomavam citrato de clomifeno (89). A ligação do citrato de clomifeno aos receptores de

estrogênio por um longo período (duas semanas) reduz a sinalização de estrogênio, provavelmente, resultando em regulação negativa de ligantes Wnt (62). Durante o ciclo menstrual, o Wnt7a é necessário para a interação entre o estroma e o epitélio, para formação da glândula endometrial e diferenciação adequada (65). A exposição ao dietilestilbestrol, uma forma sintética do estrogênio, suprimiu a expressão de Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt11, Wnt16 e FZD10 no útero neonatal de camundongos (61, 90). Esses dados sugerem que os hormônios sintéticos podem agir de forma contrária ao modo de ação dos hormônios endógenos, já que a literatura mostra que o estrogênio ativa a via de sinalização Wnt.

Considerando que a sinalização Wnt desempenha um papel importante nas funções reprodutivas femininas, alterações dos hormônios sexuais podem afetar a expressão de moléculas sinalizadoras Wnt envolvidas na padronização, proliferação e diferenciação do endométrio (62). A análise de expressão gênica das CTEs mostrou que o nível de expressão de Wnt3a, Wnt7a e β-catenina no grupo CHO foi significativamente menor do que no grupo CT. A partir desses resultados, sugere-se que hormônios exógenos podem modificar a expressão gênica de componentes da via Wnt, ligando-se aos respectivos receptores de progesterona e estrogênio e diminuindo, desta forma, os níveis basais dos hormônios endógenos.

No presente estudo, diferentemente da análise de expressão gênica, a expressão proteica não revelou diferenças significativas entre os grupos para Wnt3a, Wnt7a ou β-catenina. A síntese de proteínas eucarióticas envolve uma série de etapas nas quais um RNAm que foi transcrito e processado no núcleo e exportado para o citoplasma é traduzido em proteína pelo ribossomo. As CTs respondem a sinais de seu microambiente local (nicho). A regulação rigorosa da maquinaria da síntese de proteínas, o ribossomo e seus fatores associados, é essencial para a autorrenovação e diferenciação das CTs. (91). As funções de fatores de transcrição são reforçadas e afinadas por mecanismos relacionados à cromatina e várias regulações pós-traducionais. Essas diferentes camadas de regulação garantem que as CTs respondam rapidamente a vários estímulos em um curto período de tempo (92). As vias de sinalização que interferem na maquinaria de tradução proteica permitem que as células modulem agudamente sua saída da tradução de acordo com sinais intra e extracelulares. Em um estudo com CTs em camundongos nocaute para um determinado gene, houve aumento das taxas de síntese proteica,

relacionada ao gene em estudo, por meio de uma sinalização de regulação traducional (91, 93). MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs que funcionam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica. Um estudo mostrou que o microRNA controlou positivamente a síntese global de determinadas proteínas por meio da estimulação da tradução do RNAm da proteína ribossômica e da biogênese do ribossomo (94). Nossos dados sugerem que embora os hormônios exógenos provenientes dos CHOs possam ter induzido a alterações a nível gênico, as CTEs foram capazes de regular e normalizar a síntese proteica de ligantes Wnt para normalização da homeostase do tecido endometrial, por meio de regulações a nível traducional (sinais para maior produção de proteína) em conjunto com regulações transcricionais (microRNAs)

Outra possibilidade que hipotetizamos, ainda, é em relação ao *turnover* proteico, condição que reflete o equilíbrio entre síntese e degradação de proteínas, sendo um processo crucial para a manutenção do *pool* de proteínas celulares. O dobramento e redobramento de proteínas mal dobradas e a degradação de proteínas mal dobradas e/ou danificadas são processos envolvidos no sistema de controle de qualidade das proteínas. O dobramento e a degradação de proteínas são controlados por muitos fatores diferentes, sendo um dos mais importantes a família de proteínas de choque térmico, que podem impedir a interação inadequada de proteínas e induzir o enovelamento correto, além de desempenharem papéis significativos nas vias de degradação, incluindo a degradação do sistema ubiquitina-proteassoma e a autofagia (95). Todo esse processo requer um espaço temporal celular maior e diferente daquele envolvido na transcrição gênica, já que o RNAm é uma resposta mais rápida da célula e apresenta uma meia-vida mais curta (minutos a horas) em comparação à síntese e degradação de proteínas. Em alguns casos, o decaimento do RNA é acelerado pela expressão específica do tipo de célula, microRNAs ou proteínas de ligação ao RNA (96). Todos esses fatores podem levar a observações divergentes entre expressão gênica e proteica, como os resultados encontrados em nosso estudo. Todavia, são necessários estudos adicionais mais aprofundados para esclarecimento dos resultados e dessas possibilidades.

No presente estudo, fatores metabólitos de CTEs e de seu secretôma foram investigados por análise metabolômica. A metabolômica é uma das etapas mais recentes e sofisticadas na análise de biomateriais e indica a análise comparativa e

sistemática de sistemas biológicos. Nos processos regulatórios, metabólitos são produtos finais e seus níveis podem ser considerados como uma resposta final de sistemas biológicos a mudanças genéticas ou ambientais, representando uma combinação e equilíbrio entre as necessidades metabólicas intrínsecas e restrições metabólicas extrínsecas (68, 97). A secreção e a síntese de um amplo espectro de metabólitos e proteínas são as principais causas dos efeitos autócrinos e parácrinos das CTMs. Estudos recentes sugeriram que as propriedades físicas das CTMs podem ser afetadas por muitos fatores, incluindo o tecido de origem (98). O mapeamento de metabólitos secretados por CTMs ainda não foi realizado. No entanto, a comunidade científica já identificou aproximadamente 100 metabólitos a partir de outros tipos de CTs (68, 99). Um estudo metabolômico baseado em espectrometria de massas comparou CTs humanas derivadas de medula óssea, tecido adiposo, ligamentos periodontais e glândulas salivares, coletadas de diferentes doadores e os níveis de metabólitos endógenos foram significativamente dependentes e diferentes entre os tipos de tecido (16, 98).

Em 2016, Dos Santos E'C *et al*. propuseram que a análise de meios de cultivo por MALDI-TOF-MS poderia ser utilizada para caracterização qualitativa de embriões bovinos, permitindo a identificação de moléculas-chave durante seu cultivo *in vitro* (100). Moléculas biológicas sintetizadas no desenvolvimento e proliferação de CTs durante seu cultivo *in vitro* podem ser secretadas para o ambiente extracelular e liberadas no meio de cultivo. Um interesse crescente tem sido observado na metabolômica de secretômas de CTMs, que podem compreender metabólitos solúveis importantes para a função celular (31, 101).

Os contraceptivos hormonais afetam uma variedade de fatores metabólicos (102) e podem influenciar diferentes fatores de risco de distúrbios metabólicos, sendo que seu uso em alta dosagem aumenta o risco de anomalias do metabolismo de carboidratos, especialmente tolerância reduzida aos carboidratos. As alterações metabólicas induzidas pelo CHO podem ser determinadas por qualquer um dos componentes, com efeitos muitas vezes antagônicos e intimamente correlacionados com a natureza química e a dose dos compostos utilizados (9, 103). Em nossa análise, foram encontrados diferentes fatores da via metabólica dos carboidratos em concentrações aumentadas no grupo CHO. Esses fatores não foram encontrados na literatura como relacionados às CTEs ou ao uso de CHOs, porém, sugerimos que

essa hiperrepresentação possa estar relacionada a uma resposta anormal das células endometriais aos hormônios sintéticos.

Sitruk-Ware *et al.* estudaram os efeitos do CHO no metabolismo lipídico, indicando que seu componente estrogênico demonstrou aumentar a produção de VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*) e HDL (*High Density Lipoproteins*). Grandi *et al*. enfatizaram o fato de que os efeitos do CHO nos parâmetros do metabolismo lipídico depende das interações entre a potência do estrogênico e da progesterona (104, 105). O fosfato de diidroxiacetona (DHAP), identificado nas análises, é um intermediário na biossíntese de lipídeos e na via metabólica da glicólise. O DHAP também é o produto da desidrogenação do L-glicerol-3-fosfato que faz parte da entrada do glicerol (proveniente dos triglicerídeos) na via glicolítica (106). O ácido docosahexaenóico (DHA) é um ácido graxo ômega-3 altamente insaturado de cadeia longa e é metabolicamente relacionado a outros ácidos graxos, podendo ser sintetizado a partir do ácido α-linolênico. O DHA é encontrado em todas as membranas celulares esterificadas em fosfolipídios e outros lipídios complexos e afeta a fisiologia e a função das células e tecidos por meio de vários mecanismos, incluindo alterações na estrutura e função da membrana, na sinalização celular e na produção de mediadores lipídicos (107, 108). Giltay *et al*. conduziram um estudo mostrando o papel dos hormônios sexuais no *status* de DHA sanguíneo. Entre as mulheres, aquelas que tomavam CHOs apresentaram concentrações de DHA maiores do que aquelas que não tomavam. A administração de etinilestradiol oral levou a aumentou do DHA. Outro estudo posterior mostrou resultados semelhantes. Uma possível justificativa para isso é de que os estrogênios regulam positivamente a síntese de DHA (108, 109). Esses dados são consistentes com nossos resultados, já que foi observado hiperrepresentação de DHA no grupo CHO no secretôma das CTEs.

Além dos metabólitos citados anteriormente, surpreendentemente, foram encontrados 3 metabólitos hiperrepresentados no secretôma das CTEs que são hormônios exógenos utilizados nos CHOs, o acetato de estrona, o etinilestriol e o levonorgestrel, confirmando a possível influência dos hormônios sintéticos nas CTEs. O 6-H-5 MIG, também encontrado hiperrepresentado no secretôma das CTEs no grupo CHO, é um metabólito humano natural do 6-hidroxi-5-metoxiindol gerado no fígado pela UDP glucuoniltransferase. A glucuronidação é utilizada para auxiliar

na excreção renal de substâncias tóxicas, drogas ou outras substâncias (110). Isso sugere que o aumento deste metabólito possa estar relacionado com a metabolização e excreção dos hormônios sintéticos dos CHOs.

Outros metabólitos como a N-palmitoil arginina e o sulfato de pregnanolona foram atribuídos como não hiperrepresentados no grupo CHO. A N-palmitoil arginina pertence à classe de compostos conhecidos como N-acilamidas (uma amida do ácido palmítico de arginina). As N-acilamidas têm uma variedade de funções de sinalização na fisiologia e homeostase metabólica (111). N-acilamidas também demonstraram desempenhar um papel na migração celular e inflamação (112). Já o sulfato de pregnenolona é um composto esteróide intermediário da síntese de esteróides e produzido pelas enzimas sulfotransferases citosólicas, SULT2A1, SULT2B1a e SULT2B1b, responsáveis por produzirem sulfatos de esteróides (113). As CTEs estão sob constante influência hormonal esteróide, portanto espera-se que compostos como o sulfato de pregnenolona estejam presentes neste tipo de tecido.

Não foi possível encontrar na literatura estudos que justificassem a hiperrepresentação de todos os metabólitos identificados neste estudo, já que não há estudos sobre a metabolômica de CTEs. Todavia, foi possível observar que a maioria dos metabólitos hiperrepresentados estava no secretôma, provavelmente devido ao fato das células secretarem a maior parte de sua metabolização para o seu meio externo.

A falha de implantação é considerada uma das principais barreiras na fertilidade humana e pode ser originada de fatores uterinos, bem como de fatores embrionários. Uma vez que os processos de implantação e peri-implantação envolvem a comunicação entre o embrião e o útero, ambos os fatores devem ser considerados para evitar falhas de implantação. Hipotetizamos que a diminuição na expressão gênica de ligantes Wnts a longo prazo pode levar a uma menor espessura endometrial e a um desenvolvimento endometrial abaixo do ideal, sendo um dos possíveis fatores responsáveis por falhas de implantação. Avaliações futuras mais aprofundadas sobre o uso prolongado de CHOs podem confirmar possíveis prejuízos adquiridos à via de sinalização Wnt endometrial, refletindo na fisiologia endometrial normal. Os papéis dos membros da sinalização Wnt devem ser melhores compreendidos para que a barreira de implantação possa ser superada

com a manipulação dessa via, especialmente por meio de tecnologias de fertilização *in vitro*.

Referente à análise metabolômica, as alterações encontradas em comparação ao grupo CT sugerem que os hormônios sintéticos são capazes de modificar o ambiente metabólico celular e provavelmente acarretar prejuízos a longo prazo. Apesar dessas alterações, são necessários estudos futuros mais direcionados para esclarecer e confirmar os efeitos dos CHOs nas CTEs e como podem influenciar seu metabolismo e consequentemente sua homeostase celular.

Quanto às limitações do nosso trabalho, a variabilidade genética das voluntárias é um fator limitante. Porém, não foi possível manter as mesmas participantes nos dois grupos para todo o estudo, já que mulheres que faziam uso de CHO não aceitaram a interrupção do mesmo e mulheres que não faziam uso de CHO não aceitaram iniciar o uso do mesmo.

7 CONCLUSÃO

Com este estudo, pudemos demonstrar que o uso de CHO altera a expressão gênica de Wnt3a, Wnt7a e β-Catenina em CTEs, porém não altera a expressão proteica desses componentes da via de sinalização Wnt, sendo a sua síntese normal. Além disso, a análise metabolômica permitiu inferir que o metabolismo celular e, principalmente, secretômico das CTEs sofre alterações sob influência do CHO.

8 REFERÊNCIAS

1. E H. A brief guide to the menstrual cycle and oral contraceptive use for researchers in behavioral endocrinology. Hormones and behavior. 2020;119.
2. M M, S G, S M. The normal menstrual cycle in women. Animal reproduction science. 2011;124(3-4).
3. K I. The normal menstrual cycle. Current problems in pediatric and adolescent health care. 2022;52(5).
4. L G-A, LF H, K R, K N, RC F, L G, et al. Mapping the temporal and spatial dynamics of the human endometrium in vivo and in vitro. Nature genetics. 2021;53(12).
5. I S, DA G, FL C, A E-Z, PT S. A Role for Androgens in Epithelial Proliferation and Formation of Glands in the Mouse Uterus. Endocrinology. 2016;157(5).
6. AK S, VU B, I C-L, RE L. How Mechanical Forces Change the Human Endometrium during the Menstrual Cycle in Preparation for Embryo Implantation. Cells. 2021;10(8).
7. S T, MT O, AE H, NL J, E S, LC G. Dickkopf-1, an inhibitor of Wnt signaling, is regulated by progesterone in human endometrial stromal cells. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2006;91(4).
8. M B-L, R R, R F, N A, E R, O S, et al. Prediction value of anti-Mullerian hormone (AMH) serum levels and antral follicle count (AFC) in hormonal contraceptive (HC) users and non-HC users undergoing IVF-PGD treatment. Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology. 2017;33(10).
9. V DL, MC M, V C, P P, G M. Hormonal contraceptives: pharmacology tailored to women's health. Human reproduction update. 2016;22(5).
10. BM T, HL H, DV S, L B-M, XAK JdJ. The acute effect of the menstrual cycle and oral contraceptive cycle on measures of body composition. European journal of applied physiology. 2021.
11. S D, L J, P H, K K. Oral contraceptive use and fracture risk-a retrospective study of 12,970 women in the UK. Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 2017;28(8).
12. M S, A S, R H, M G. The effect of female sex steroid hormones on osteogenic differentiation of endometrial stem cells. Molecular biology reports. 2020;47(5).
13. K G, A K, R B, S S, N C. Effects of Different Contraceptive Methods on Cervico-Vaginal Cytology. Journal of clinical and diagnostic research : JCDR. 2017;11(7).
14. X M, TE I, J Z, A R, Z Y, J J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. Journal of translational medicine. 2007;5.
15. K K, H C. Wnt/β-catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells. Developmental biology. 2017;428(2).
16. DSC B, CSH J, IMC M, KM R, MB O, JF M, et al. Metabolomic Applications in Stem Cell Research: a Review. Stem cell reviews and reports. 2021.
17. MM M, M C, C A, L B-E, E B, BK Y. Clinical potential of human amniotic fluid stem cells. Journal of perinatal medicine. 2022.
18. X S, A M, I C, H T, C S. Uterine stem cells: from basic research to advanced cell therapies. Human reproduction update. 2018;24(6).

19. PH vdH, Y W, M vdZ, CW B, LJ B. Interaction between sex hormones and WNT/β-catenin signal transduction in endometrial physiology and disease. Molecular and cellular endocrinology. 2012;358(2).
20. S X, RWS C, EHY N, WSB Y. Spatial and temporal characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells activity during the menstrual cycle. Experimental cell research. 2017;350(1).
21. N T, A M, DK H. Endometrial Stem Cell Markers: Current Concepts and Unresolved Questions. International journal of molecular sciences. 2018;19(10).
22. X Z, B P, G Y, H S, Y H, L D. Stem Cells and Endometrial Regeneration: From Basic Research to Clinical Trial. Current stem cell research & therapy. 2019;14(4).
23. S X, RWS C, T L, EHY N, WSB Y. Understanding the regulatory mechanisms of endometrial cells on activities of endometrial mesenchymal stem-like cells during menstruation. Stem cell research & therapy. 2020;11(1).
24. PD G. Stem Cells from Menstrual Blood: Wealth Out of Waste. Global Journal of Surgery and Surgical Techniques. 2022;2(1).
25. VA P. On the concept of stem cell and a model of functional-morphological structure of the endometrium. Contraception. 1978;18(3).
26. RW C, KE S, CE G. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. Biology of reproduction. 2004;70(6).
27. Y L, R N, F Y, Y Y, S L, Y S, et al. Biological characteristics of human menstrual blood-derived endometrial stem cells. Journal of cellular and molecular medicine. 2018;22(3).
28. F A-M, J C, P L-C, C A-D, A F, FE F, et al. Characterization of menstrual stem cells: angiogenic effect, migration and hematopoietic stem cell support in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. Stem cell research & therapy. 2015;6(1).
29. AI C. Adult mesenchymal stem cells and women's health. Menopause (New York, NY). 2015;22(2).
30. M C, RWS C, FHC C, J L, T L, RTK P, et al. Myometrial Cells Stimulate Self-Renewal of Endometrial Mesenchymal Stem-Like Cells Through WNT5A/β-Catenin Signaling. Stem cells (Dayton, Ohio). 2019;37(11).
31. PK L, S K, R M, V S, R K, RS V. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. Cytokine & growth factor reviews. 2019;46.
32. M D, K LB, I M, I S-C, F M, D K, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4).
33. L C, J Q, C X. The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. Stem cell research & therapy. 2019;10(1).
34. Z W, Y W, T Y, J L, X Y. Study of the reparative effects of menstrual-derived stem cells on premature ovarian failure in mice. Stem cell research & therapy. 2017;8(1).
35. C B, A B, SX D, JJ Z. Wnt signaling activation: targets and therapeutic opportunities for stem cell therapy and regenerative medicine. RSC chemical biology. 2021;2(4).
36. S T, X Y, MW C, F V, R B. Multifaceted interaction between the androgen and Wnt signaling pathways and the implication for prostate cancer. Journal of cellular biochemistry. 2006;99(2).
37. TW H. The evolution of the Wnt pathway. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2012;4(7).

38. RR B, MD L. Wnt signaling and adipocyte lineage commitment. Cell cycle (Georgetown, Tex). 2008;7(9).
39. R H, M M, A H. Wnt signaling pathway: A comprehensive review. Cell biology international. 2022;46(6).
40. H C, R N. Wnt/β-catenin signaling and disease. Cell. 2012;149(6).
41. R N, H C. Wnt/β-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. Cell. 2017;169(6).
42. SG P, BA C, JM M, R C, CA L, R B-S, et al. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. Journal of hematology & oncology. 2017;10(1).
43. H C. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. Cell. 2006;127(3).
44. Z S, S A. Wnt signaling in development and tissue homeostasis. Development (Cambridge, England). 2018;145(11).
45. L G, G L, P M, R M, R B, R A, et al. Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. Genes & development. 2010;24(22).
46. JL S, WI W. The β-catenin destruction complex. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2013;5(1).
47. S K, M K, A Z, I N, S S. Role of Wnt signaling on proliferation of menstrual blood derived stem cells. Journal of stem cells & regenerative medicine. 2013;9(1).
48. L A, T P, S S, E E, S B, S D, et al. YAP/TAZ incorporation in the β-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. Cell. 2014;158(1).
49. Y K, R H. Wnt signal transduction pathways. Organogenesis. 2008;4(2).
50. T L, RWS C, CL L, PCN C, RHW L, EHY N, et al. WNT5A Interacts With FZD5 and LRP5 to Regulate Proliferation and Self-Renewal of Endometrial Mesenchymal Stem-Like Cells. Frontiers in cell and developmental biology. 2022;10.
51. JF T, X Y, MJ Z, SP F, PW N, M D. Maternal obesity downregulates myogenesis and beta-catenin signaling in fetal skeletal muscle. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2009;296(4).
52. HX W, FR T, GM K. Identification of WNT/beta-CATENIN signaling pathway components in human cumulus cells. Molecular human reproduction. 2009;15(1).
53. P F, TM B, T W, H F. Effect of removing cumulus cells from porcine cumulus-oocyte complexes derived from small and medium follicles during IVM on the apoptotic status and meiotic progression of the oocytes. Theriogenology. 2016;86(7).
54. K M, F M, Z Z, T M, S I, KR S, et al. Nuclear hormone receptor LXRα inhibits adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells with Wnt/beta-catenin signaling. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 2016;96(2).
55. AB R, KM C. Wnt target genes and where to find them. F1000Research. 2017;6.
56. A G-M, M C. WNT Signaling in Melanoma. International journal of molecular sciences. 2020;21(14).
57. J B, AJ Z, J L, B G-K, G B. The Importance of the Canonical Wnt Signaling Pathway in the Porcine Endometrial Stromal Stem/Progenitor Cells: Implications for Regeneration. Stem cells and development. 2015;24(24).
58. J K, MM K, A A, A B, AJ Z. Gene expression of WNTs, β-catenin and E-cadherin during the periimplantation period of pregnancy in pigs--involvement of steroid hormones. Theriogenology. 2011;76(4).
59. SL E, GJ S, DJ H, PG G. Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. Stem cells (Dayton, Ohio). 2004;22(5).

60. F S, A C, SL E, P G. Real-Time Analysis of Endogenous Wnt Signalling in 3D Mesenchymal Stromal Cells. Stem cells international. 2016;2016.
61. F T, G A, R D. The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation. Journal of assisted reproduction and genetics. 2015;32(3).
62. S M, F A, M M, M B, L S, R A, et al. The effects of letrozole and clomiphene citrate on ligands expression of Wnt3, Wnt7a, and Wnt8b in proliferative endometrium of women with Polycystic ovarian syndrome. Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology. 2018;34(9).
63. S T, NR N, LC K, M VW, J H, S L, et al. Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2003;88(8).
64. X W, F L, S Z, X X, J L, Q W, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-Derived Conditioned Medium Promotes Human Endometrial Cell Proliferation through Wnt/ β-Catenin Signaling. BioMed research international. 2022;2022.
65. KA D, J F, K H, EB R, G S, JM D, et al. Postnatal deletion of Wnt7a inhibits uterine gland morphogenesis and compromises adult fertility in mice. Biology of reproduction. 2011;85(2).
66. S S, P H, A S, C L, JV O, C F, et al. Wingless (Wnt)-3A induces trophoblast migration and matrix metalloproteinase-2 secretion through canonical Wnt signaling and protein kinase B/AKT activation. Endocrinology. 2010;151(1).
67. P G, S A-M, M P, B L, F R, K G, et al. Metabolomics Analysis of Mesenchymal Stem Cells. International journal of molecular and cellular medicine. 2019;8(Suppl1).
68. K G, P G, A T-B, MJ M, A M-V, M R-T, et al. Looking at time dependent differentiation of mesenchymal stem cells by culture media using MALDI-TOF-MS. Cell and tissue banking. 2021.
69. AE S, L B, T K. Metabolomic Strategies in Biomarker Research-New Approach for Indirect Identification of Drug Consumption and Sample Manipulation in Clinical and Forensic Toxicology? Frontiers in chemistry. 2019;7.
70. J C, A L-G, V C, J B, M D, M KG, et al. The Reparative Abilities of Menstrual Stem Cells Modulate the Wound Matrix Signals and Improve Cutaneous Regeneration. Frontiers in physiology. 2018;9.
71. A P, F A, F A-A, E S, L F, M K, et al. The Wnt/β-catenin signaling in endometriosis, the expression of total and active forms of β-catenin, total and inactive forms of glycogen synthase kinase-3β, WNT7a and DICKKOPF-1. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology. 2018;220.
72. G R, J W, KS T, D U, A R, J W, et al. Optimization and scale-up culture of human endometrial multipotent mesenchymal stromal cells: potential for clinical application. Tissue engineering Part C, Methods. 2013;19(1).
73. HP GC, C S, H E, C G, E M, P H. Regulation of matrix metalloproteinases activity studied in human endometrium as a paradigm of cyclic tissue breakdown and regeneration. Biochimica et biophysica acta. 2012;1824(1).
74. R G, R H, KA K, C B. A re-appraisal of the morphological changes within the endometrium during menstruation: a hysteroscopic, histological and scanning electron microscopic study. Human reproduction (Oxford, England). 2009;24(6).
75. Y K, Y S, C R, G Y. Endometrial stem/progenitor cells and their roles in immunity, clinical application, and endometriosis. Stem cell research & therapy. 2021;12(1).
76. I C, A M, C G-S, L P, A F, PT S, et al. Reconstruction of endometrium from human endometrial side population cell lines. PloS one. 2011;6(6).

77. KE S, CE G. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. Human reproduction (Oxford, England). 2007;22(11).
78. K M, MT D, JS CV, Y F, BD Y, T M, et al. Generation of Progesterone-Responsive Endometrial Stromal Fibroblasts from Human Induced Pluripotent Stem Cells: Role of the WNT/CTNNB1 Pathway. Stem cell reports. 2018;11(5).
79. B G, IA B, JJ B. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. Seminars in reproductive medicine. 2007;25(6).
80. A B, S G, A D. An update on stem cell therapy for Asherman syndrome. Journal of assisted reproduction and genetics. 2020;37(7).
81. M C, RW C, WS Y. Label-retaining stromal cells in mouse endometrium awaken for expansion and repair after parturition. Stem cells and development. 2015;24(6).
82. Y W, P H-M, EE H, HJ K, P F, J V, et al. Progesterone inhibition of Wnt/beta-catenin signaling in normal endometrium and endometrial cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2009;15(18).
83. TX C, D H, X W, XH L, G H, X J. From pathogenesis of acne vulgaris to anti-acne agents. Archives of dermatological research. 2019;311(5).
84. S M, C D. Involvement of the Wnt/β-catenin signaling pathway in the cellular and molecular mechanisms of fibrosis in endometriosis. PloS one. 2013;8(10).
85. JW J, HS L, HL F, RR B, MM T, SY T, et al. beta-catenin mediates glandular formation and dysregulation of beta-catenin induces hyperplasia formation in the murine uterus. Oncogene. 2009;28(1).
86. O F, S B, J R, D D. Porcupine-dependent Wnt signaling controls stromal proliferation and endometrial gland maintenance through the action of distinct WNTs. Developmental biology. 2017;422(1).
87. OA M, M J, C L-D, K K, HJ C, D D. Uterine Wnt/beta-catenin signaling is required for implantation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102(24).
88. J F, H Z, TE S. Progesterone inhibits uterine gland development in the neonatal mouse uterus. Biology of reproduction. 2012;86(5).
89. AJ B, OG N, E J. Effects of clomiphene citrate stimulation on endometrial structure in infertile women. Human reproduction (Oxford, England). 1996;11(4).
90. K H, S Y, SN R, EB R, TE S, FJ D, et al. WNTs in the neonatal mouse uterus: potential regulation of endometrial gland development. Biology of reproduction. 2011;84(2).
91. JA S, K L-A, R G, FM W. Translational control of stem cell function. Nature reviews Molecular cell biology. 2021;22(10).
92. M dD, B M. Ubiquitin Dynamics in Stem Cell Biology: Current Challenges and Perspectives. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology. 2020;42(3).
93. K L-A, EW M, I S, BM L, AO P, KH S, et al. An evolutionarily conserved ribosome-rescue pathway maintains epidermal homeostasis. Nature. 2018;556(7701).
94. UA Ø, FC N, AH L. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. Molecular cell. 2008;30(4).
95. P B, NK O, B K. Regulation of protein turnover by heat shock proteins. Free radical biology & medicine. 2014;77.

96. A B, Y Z, YF H, N D, EJ R, AG C, et al. Characterizing RNA stability genome-wide through combined analysis of PRO-seq and RNA-seq data. BMC biology. 2021;19(1).
97. N S-C, HH N. The metabolic programming of stem cells. Genes & development. 2017;31(4).
98. SJ L, T Y, SH A, DK L, SN K, HJ L, et al. Comparative study on metabolite level in tissue-specific human mesenchymal stem cells by an ultra-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry. Analytica chimica acta. 2018;1024.
99. AR C, S SP, G I, M VB, A A, F F, et al. Mesenchymal Stem/ Stromal Cells metabolomic and bioactive factors profiles: A comparative analysis on the umbilical cord and dental pulp derived Stem/ Stromal Cells secretome. PloS one. 2019;14(11).
100. dos Santos ÉC, de Lima CB, Annes K, Milazzotto MP. Noninvasive characterization of metabolites secreted in culture media by bovine embryos during in vitro production. Metabolomics. 2016;12(5):1-9.
101. JZ L, H Q, J W, F Z, ZB J, JY S, et al. Metabolic profiles of adipose-derived and bone marrow-derived stromal cells from elderly coronary heart disease patients by capillary liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. International journal of molecular medicine. 2018;41(1).
102. R S-W. Hormonal contraception and thrombosis. Fertility and sterility. 2016;106(6).
103. C B, M F, E R, I B, G B. Pharmacodynamics of combined estrogen-progestin oral contraceptives: 1. Effects on metabolism. Expert review of clinical pharmacology. 2017;10(3).
104. R S-W, A N. Characteristics and metabolic effects of estrogen and progestins contained in oral contraceptive pills. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism. 2013;27(1).
105. G G, A N, A C. Metabolic impact of combined hormonal contraceptives containing estradiol. Expert opinion on drug metabolism & toxicology. 2016;12(7).
106. McIntyre TM, Snyder F, Marathe GK. Ether-linked lipids and their bioactive species. ScienceDirect2008.
107. PC C. Docosahexaenoic Acid. Annals of nutrition & metabolism. 2016;69 Suppl 1.
108. AR M, L S, H T, G G, GV S. Docosahexaenoic acid in red blood cells of women of reproductive age is positively associated with oral contraceptive use and physical activity. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 2009;80(1).
109. EJ G, LJ G, AW T, MB K, PL Z. Docosahexaenoic acid concentrations are higher in women than in men because of estrogenic effects. The American journal of clinical nutrition. 2004;80(5).
110. X L, X W, H S, Z G, X L, T Y, et al. Urinary metabolic variation analysis during pregnancy and application in Gestational Diabetes Mellitus and spontaneous abortion biomarker discovery. Scientific reports. 2019;9(1).
111. HB B, JM W. The expanding field of cannabimimetic and related lipid mediators. British journal of pharmacology. 2005;144(4).
112. S R, JM S, E L, SM T, B R, A B, et al. Novel endogenous N-acyl amides activate TRPV1-4 receptors, BV-2 microglia, and are regulated in brain in an acute model of inflammation. Frontiers in cellular neuroscience. 2014;8.
113. C H. Pregnenolone sulfate: from steroid metabolite to TRP channel ligand. Molecules (Basel, Switzerland). 2013;18(10).

ANEXOS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto

Influência dos contraceptivos orais em componentes da via Wnt e na metabolômica de células-tronco endometriais humanas derivadas de fluido menstrual

1. Informações iniciais

Para que um indivíduo possa participar de uma pesquisa envolvendo novos tratamentos médicos, aparelhos ou novos procedimentos, o mesmo deve dar o seu consentimento livre e esclarecido de tal participação. Este consentimento baseia-se no entendimento da natureza e risco do tratamento, aparelho ou procedimento. É responsabilidade do coordenador da pesquisa fornecer, ao indivíduo que participará da pesquisa, as informações necessárias para este entendimento.

2. Informações sobre a pesquisa

Todo estudo com células-tronco adultas nesta universidade ou em qualquer outro ambiente de pesquisa necessita-se da coleta de um pequeno conjunto de células. Para esta pesquisa, será utilizado o sangue menstrual expelido naturalmente pelo corpo, a cada mês, durante o segundo dia do ciclo. Este material será coletado pela própria voluntária, com auxílio de um coletor menstrual, que deverá ser utilizado por um período de 4 horas durante o segundo dia do ciclo. O material coletado será entregue ao laboratório de pesquisa para a seleção das células de interesse (células mesenquimais). Após serem selecionadas, as células serão armazenadas em nitrogênio líquido para posteriores análises.

Para a seleção e crescimento celular, o sangue menstrual passará por etapas de centrifugação e cultivo até que as células de interesse (células mesenquimais) cresçam. Após a expansão destas células, elas serão submetidas à análises moleculares.

Vale salientar, que o procedimento de coleta do tecido liberado na menstruação **não envolve processos cirúrgicos ou qualquer outro procedimento invasivo**.

3. Objetivos e Justificativa

Este estudo tem por objetivo estudar o efeito do uso de contraceptivos hormonais orais no metabolismo das células-tronco endometriais mesenquimais por meio da via Wnt e metabolômica do meio de cultivo e das próprias células.

As células-tronco provenientes do endométrio, perdidas durante a menstruação, apresentam morfologia semelhante às células-tronco mesenquimais, além de possuírem capacidade de autorrenovação, proliferação e diferenciação em outros tipos celulares. A biodisponibilidade de células-tronco mesenquimais diminui com o aumento da idade. Portanto, estudar o efeito da utilização de contraceptivos hormonais na via de sinalização Wnt/β-catenina e entender o perfil metabolômico e secretômico de células-tronco endometriais mesenquimais humanas seria essencial para buscar

novos marcadores de receptividade e descobrir novos processos relacionados ao crescimento endometrial e janela de implantação.

4. Riscos e desconforto

Esta pesquisa **não proporciona nenhum risco físico** às participantes, uma vez que o procedimento de coleta do material não é invasivo, embora possa gerar um pequeno desconforto caso a participante não esteja habituada ao uso do coletor menstrual.

Não haverá nenhum risco psicológico ou moral quanto à participação no estudo, uma vez que a participação é voluntária. Caso não se sinta confortável após a doação do material, a participante poderá solicitar a retirada dos dados obtidos a partir do material concedido por ela até o término do estudo conforme descrito neste termo de consentimento que será assinado por ela.

5. Benefícios

Não haverá benefícios imediatos às voluntárias em participar deste estudo.

6. Confidencialidade

Este trabalho é de caráter confidencial, portanto, quaisquer dados referentes aos registros obtidos serão mantidos em sigilo até o momento da publicação do artigo.

7. Danos relacionados a esta pesquisa

Como se trata da utilização do tecido eliminado naturalmente durante a menstruação, **este trabalho não oferece nenhum dano físico para a voluntária** que concordar em participar deste projeto. É assegurado que a participante tem permissão de retirar do estudo os dados provenientes das células cedidas por ela até o término deste trabalho sem que haja qualquer penalidade.

8. Estoque das células

Necessitamos da autorização da voluntária para armazenar essas células em nosso laboratório que se encontra no endereço Rua Embaú, nº 231, Vila Clementino, São Paulo – SP. As células serão armazenadas em condições adequadas, mantidas em nitrogênio líquido com adição de crioprotetor às células, a fim de manter suas funções biológicas íntegras. Essas células armazenadas em nosso laboratório não apresentarão despesas para a voluntária.

9. Estoque das células após o término do estudo

Após o término do estudo, se não forem utilizadas todas as células, elas serão mantidas no laboratório por um período de 2 anos ou até que o trabalho seja publicado. Ao final deste prazo as células serão descartadas de acordo com protocolo de descarte de material biológico.

As células serão armazenadas com a finalidade de evitar a necessidade de adquirir mais material biológico, caso necessite repetir alguma fase do experimento. Durante o período armazenado a participante poderá retirar suas células a qualquer momento, sem que haja qualquer penalidade.

10. Dúvidas sobre a pesquisa

Se a participante tiver alguma dúvida sobre esta pesquisa, ou tiver qualquer problema relacionado à pesquisa, deverá entrar em contato com o pesquisador principal.

Prof. Dr. Edson Guimarães Lo Turco
LEAF – Laboratório de Estudos Avançados em Fertilidade/ Setor de Reprodução Humana
Rua Pedro de Toledo, 781 – Vila Clementino
Complemento: 1ºandar/ Sala 2

Gabrielle Ferrante Alves de Moraes
Centro de Pesquisa em Urologia / Setor de Reprodução Humana
LEAF – Laboratório de Estudos Avançados em Fertilidade/ Setor de Reprodução Humana
Rua Pedro de Toledo, 781 – Vila Clementino
Complemento: 1ºandar/ Sala 2
Telefone: (11) 97261-3041

Ou entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) o qual é uma instância colegiada, constituída pela instituição em respeito às normas da Resolução nº 466 de 08 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, com função de revisar todos os protocolos de pesquisa com a responsabilidade pelas decisões sobre a ética da pesquisa a ser desenvolvida na instituição; manter a guarda confidencial e o arquivamento do protocolo completo, que ficará a disposição das autoridades sanitárias; desempenhar papel consultivo e educativo, fomentando a reflexão em torno da ética na ciência; receber dos sujeitos da pesquisa ou de qualquer parte, denúncias de abusos ou notificação sobre fatos adversos que possam alterar o curso normal do estudo, deliberando pela continuidade, modificação ou suspensão da pesquisa, devendo adequar o termo de consentimento e manter comunicação regular e permanente com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP
Rua Botucatu, 572 – 1º andar Cj. 14
Telefone: (11) 5571-1062 / Fax: (11) 5539-7162
E-mail: cepunifesp@epm.br

11. Participação voluntária

A participação neste estudo é **voluntária**. A participante é livre para desistir da coleta e deixar de participar deste estudo a qualquer momento, informando o pesquisador principal, sem que haja qualquer penalidade ou prejuízo financeiro. Após a coleta, o material doado será submetido ao procedimento experimental e caso desista da pesquisa, poderá solicitar o descarte das células.

12. Despesas e compensações

A participante não terá despesas pessoais participando desta pesquisa em qualquer fase deste estudo.

A participante não terá compensação financeira por participar, pois não há dano pessoal em decorrência deste estudo que avaliará o material que é eliminado naturalmente pelo corpo e descartado.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "**Análise de componentes da via Wnt e da metabolômica de células-tronco endometriais humanas derivadas de sangue menstrual**".

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

_____

Assinatura da participante Data: / /

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____

Assinatura do responsável pelo estudo Data: / /

Este TCLE será aplicado em duas vias, ficando uma com o pesquisador e outra com a participante do estudo.

Ficha de Anamnese

VOLUNTÁRIAS AO PROJETO:
Influência dos contraceptivos orais em componentes da via Wnt e na metabolômica de células-tronco endometriais humanas derivadas de fluido menstrual

Dados pessoais

Nome:_____

Idade: _____

Peso:_____ Altura: _____

Fumante: Sim ( ) Não ( )

Gestante: Sim ( ) Não ( )

Ciclo menstrual

Idade menarca:_____

Periodicidade do ciclo menstrual (em dias):_____

Duração do sangramento menstrual (em dias):_____

Intensidade do fluxo: Leve ( ) Moderado ( ) Intenso ( )

Dismenorréia (cólica menstrual): Sim ( ) Não ( )

Ocorrência de distúrbios menstruais como menorragias (menstruação excessiva anormal), oligomenorréia (menstruação em ciclos de mais de 40 dias) ou amenorréia (ausência de menstruação):
Sim ( ) Não ( )
Se sim, qual e com que frequência:_____

Utiliza método contraceptivo hormonal: Sim ( ) Não ( )

Se sim:

Tipo: Oral ( ) Injetável ( ) Vaginal ( ) Adesivo ( )

Nome do contraceptivo:_____

Tempo de uso:_____

Saúde

Já realizou cirurgia: Sim ( ) Não ( )

Se sim, Qual(is):_____

Uso de medicamentos: Sim ( ) Não ( )

Se sim, Qual(is):_____

Tem filho(s)? Sim ( ) Não ( )

Se sim:

Quantos: _____ Data do último parto: _____

Tipo de parto: Normal ( ) Cesária ( )

Diagnóstico de SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos), endometriose, fibrose uterina, cânceres ginecológicos:

Sim ( ) Não ( )

Se sim, Qual(is):_____

Exames ginecológicos em dia: Sim ( ) Não ( )

Data dos últimos exames realizados: _____

Frequência sexual: _____

Possui alguma doença ginecológica: Sim ( ) Não ( )

Se sim:

HIV ( )

HPV ( )

Lesões ativas por HPV ( )

Hepatite B ( )

Hepatite C ( )

Clamídia ( )

Sífilis ( )

Gonorréia ( )

Outras: _____