

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

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

Relação entre a adenomiose e as proteínas PIWI

Marília Meneghel Colla Mattia

Porto Alegre, 2018

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

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

Relação entre a adenomiose e as proteínas PIWI

Marília Meneghel Colla Mattia

Orientador: Professor Dr. João

Sabino Cunha Filho

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

Porto Alegre, 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Mattia, Marília Meneghel Colla
Relação entre a adenomiose e as proteínas PIWI /
Marília Meneghel Colla Mattia. -- 2018.
105 f.
Orientador: João Sabino Lahorgue Cunha-Filho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Adenomiose. 2. Proteínas PIWI. 3. Desordens
uterinas. 4. Expressão proteica. 5.
Imuno-histoquímica. I. Cunha-Filho, João Sabino
Lahorgue, orient. II. Título.

Epígrafe

“Vorfelan rhinata morie”

Traduz-se por “A busca pelo saber molda o homem”

Patrick Rothfuss – O Temor do sábio: A crônica do matador do rei – segundo dia

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Calisto e Morgana e à
minha irmã, Gabriela, com todo meu amor!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em especial, aos meus pais, Calisto e Morgana e à minha irmã, Gabriela, pelo apoio incondicional às minhas escolhas, ao incentivo incessante para a realização dos meus sonhos, por me ensinarem que é através dos estudos que podemos nos tornar a nossa melhor versão e ao amor que cerne nossa família.

Agradeço imensamente ao meu orientador, professor Dr. João Sabino Lahorgue da Cunha Filho, por me aceitar no seu círculo profissional, me ensinar, estimular, incentivar e cobrar durante esses dois anos de mestrado. Me sinto extremamente afortunada de ter tido um excelente professor como orientador. Agradeço ao professor Dr. Carlos Augusto Bastos de Souza, com quem tive as conversas iniciais sobre mestrado, ainda durante a graduação na UFCSPA e que me apresentou e direcionou para o trabalho com o Dr. Sabino. Além disso, teve papel importantíssimo na execução desse projeto.

Agradeço o auxílio dos alunos de iniciação científica, Pedro da Rocha Olsen, Helena Margot Flôres da Silva e Frederico Guilherme Flores Soares Bredemeier, que foram essenciais durante o planejamento e execução dos experimentos deste trabalho e, aos quais pude dividir o que sei.

Agradeço o auxílio da Dra. Emily Pilar, da técnica de laboratório Flávia Giusti e dos estagiários, Jully de Oliveira e Willian Pereira que me permitiram utilizar as dependências da Unidade de Patologia Experimental (UPE) para a realização da técnica de imuno-histoquímica durante a execução desse trabalho e me auxiliaram na confecção das lâminas. Agradeço também a Dra. Alexandra Ponso que se prontificou em identificar e selecionar as amostras do estudo, assim como analisar as lâminas de imuno-histoquímica. Ainda, agradeço o auxílio imprescindível da Carina Henriques, arquivista do Setor de Patologia Cirúrgica que separou as lâminas e blocos de parafina

das pacientes incluídas no estudo. Sem seu trabalho, a execução desse estudo seria impossível.

Agradeço aos colegas e professores da Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia pelo convívio, ensinamentos, sugestões, críticas e opiniões realizadas nesses dois anos de mestrado.

Agradeço aos meus familiares, avós, tios, primos, primas e amigos que fizeram e fazem parte do meu desenvolvimento pessoal e acompanharam desde cedo as minhas vitórias e conquistas, além de sempre que possível, estarem presentes durante as comemorações destes momentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 PROBLEMA DE PESQUISA	19
2.2 MÉTODOS	19
2.3 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE	19
2.4 ESTRATÉGIA DE BUSCA.....	19
2.5 SELEÇÃO DOS ESTUDOS E EXTRAÇÃO DOS DADOS.....	20
2.6 RESULTADOS	20
2.7 MAPA CONCEITUAL	24
2.8 ADENOMIOSE	24
2.8.1 Características gerais	24
2.8.2 Papel da adenomiose na infertilidade	30
2.9 PROTEÍNAS PIWI	32
2.9.1 Nomenclatura	32
2.9.2 Características gerais	33
2.9.3 Aspectos bioquímicos das proteínas PIWI de humanos.....	35
2.9.4 Envolvimento das proteínas PIWI de humanos com o câncer.....	39

2.9.5 Vínculo entre as proteínas PIWI e os piRNAs	45
3 JUSTIFICATIVA	48
4 HIPÓTESES	49
4.1 HIPÓTESE NULA.....	49
4.2 HIPÓTESE ALTERNATIVA.....	49
5 OBJETIVOS	50
5.1 PRINCIPAL	50
5.2 SECUNDÁRIOS.....	50
REFERÊNCIAS	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
PERSPECTIVAS	64
ANEXOS	65
ANEXO A - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO HCPA	65
ANEXO B - APROVAÇÃO NA PLATAFORMA BRASIL	69
ANEXO C - TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	70
ANEXO D - STROBE Statement - Checklist of items that should be included in reports of <i>cross-sectional studies</i>	71
ANEXO E – Informações essenciais do anticorpo anti-PIWIL1.....	73
ANEXO F - Informações essenciais do anticorpo anti-PIWIL2	77
ANEXO G – Informações essenciais do anticorpo anti-PIWIL4	78

LISTA DE ABREVIATURAS

aa – Aminoácido(s)

AGO – família de proteínas Argonauta

Ago3 – *Argonaute-3*

AUB – *Aubergine*

EMI – *endometrial-myometrial interface*

ET(s) – elemento(s) transponível(is)

GnRHa(s) – Antagonista (s) do hormônio liberador de gonadotrofinas

IHQ – Imuno-histoquímica

MeSH – *Medical Subject Headings*

MHC II – Complexo de histocompatibilidade de classe II

mRNA(s) – RNA(s) mensageiro(s)

miRNA(s) – *micro RNA(s)*

MAS – *multiple sequence alignment*

NK – *natural killers*

OB – *oligonucleotide/oligosaccharide binding*

PAZ – domínio *PIWI/Argonaute/Zwille*

piRNA(s) – *PIWI-interacting RNA(s)*

PIWI – *P-element-induced wimpy testis*

siRNA(s) – *small-interfering RNA(s)*

TNBC – *triple negative breast 8yster*

RM – Ressonância magnética

US – Ultrassom

UTV – Ultrassom transvaginal

ZJ – Zona juncional

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do Mapa Conceitual	24
Figura 2 – Ilustração da adenomiose no miométrio.....	25
Figura 3 – Identificação da adenomiose em imagem de ressonância magnética	32
Figura 4 - Alinhamento múltiplo de sequências de proteínas PIWI.....	36
Figura 5 - Estrutura das proteínas PIWI.....	38
Figura 6 - Síntese dos piRNAs.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Revisão da literatura em quatro bases de dados com base na leitura do título e resumo	22
Tabela 2 – Nomenclatura das proteínas PIWI particular a cada espécie.....	33
Tabela 3 - Estudos que identificaram a presença das proteínas PIWI e/ou piRNAs em diversos tipos de câncer	41

RESUMO

Introdução: A adenomiose é uma patologia benigna que acomete mulheres em idade fértil e é caracterizada pela a invasão do endométrio no miométrio, podendo inclusive estar relacionada com dor e piora de alguns desfechos reprodutivos. Para que ocorra esta invasão, é necessária uma série de atividades celulares tais como: crescimento/divisão, divisão celular em ambiente hostil, migração celular e sobrevivência. As proteínas chamadas *P-element-induced wimpy testis* (PIWI) são responsáveis pela regulação da atividade de elementos transponíveis e já foram descritas em diversos tipos de câncer, incluindo câncer endometrial e ovariano, atuando na sobrevivência, divisão e migração da célula tumoral. Entretanto, nunca foram descritas em mulheres com adenomiose. **Objetivo:** Identificar a presença e relação das proteínas PIWI em tecido proveniente de hysterectomia com diagnóstico positivo de adenomiose difusa. **Materiais e Métodos:** Foi realizado um estudo transversal controlado. 72 participantes foram separadas em dois grupos, controle (n = 36) e adenomiose (n = 36). As peças anatômicas foram provenientes Serviço de Patologia Cirúrgica do HCPA. Os dados das pacientes foram obtidos através da consulta dos prontuários. A identificação das proteínas PIWI foi realizada a partir de técnica de imuno-histoquímica com anticorpos anti-PIWIL 1, anti-PIWIL 2 e anti-PIWIL 4 e anticorpo secundário. A avaliação da expressão proteica foi realizada através de uma análise quantitativa, com a utilização do software de imagens ImageJ e do *digital histological score* (DHSCORE), e de uma análise qualitativa a partir da identificação da expressão pela médica patologista. Nesta etapa, foram analisados o endométrio normal (grupo controle), endométrio de adenomiose e tecido de adenomiose (grupo adenomiose). Para variáveis categóricas foi utilizado o teste *qui-quadrado* e para variáveis contínuas foi utilizado o teste *t de Student* e ANOVA ou *Mann-Whitney* e

Kruskal-Wallis de acordo com a distribuição dos dados, o nível de significância adotado foi de 5%. **Resultados:** As participantes têm uma média de idade de 44,28 \pm 5,76 anos e 45,81 \pm 4,86 anos no grupo controle e adenomiose, respectivamente ($p \geq 0,05$). Com relação ao índice de massa corporal, o grupo controle tem média de 28,07 \pm 4,98 kg/m² e o grupo adenomiose tem média de 28,31 \pm 3,94 kg/m² ($p \geq 0,05$). As participantes do estudo tinham em média 12,75 \pm 1,87 anos e 12,86 \pm 1,98 anos quando ocorreu a menarca no grupo controle e adenomiose, respectivamente ($p \geq 0,05$). Todas as participantes se encontravam no menacme. O grupo controle apresentou uma mediana de 2,50 [2,00 – 4,00] gestações e o grupo adenomiose apresentou uma mediana de 3,00 [2,00 – 3,75] gestações ($p \geq 0,05$). 77,8% (n = 28) das participantes do grupo controle não realizou aborto, no grupo adenomiose, 74,3% (n = 26) participantes não realizaram aborto ($p \geq 0,05$). Com relação aos hábitos de fumo, no grupo controle 51,5% (n = 17) das participantes se declarou não fumante, 30,3 % (n = 10) se declararam fumante e 18,2% (n = 6) se declararam ex-fumantes. No grupo adenomiose, 66,4% (n = 24) das participantes se declarou não fumante, 16,7% (n = 6) se declararam fumantes e 16,7% (n = 6) se declararam ex fumantes ($p \geq 0,05$). A avaliação da expressão proteica analisou o endométrio normal do grupo controle e do grupo adenomiose foram analisados o endométrio e o tecido de adenomiose. A proteína PIWIL1 apresentou expressão reduzida quando comparado o tecido de adenomiose com o endométrio normal do grupo controle ($p = 0,003$). O mesmo padrão foi observado quando comparados no grupo adenomiose, o endométrio e o tecido de adenomiose ($p = 0,0001$) e os endométrios normal (grupo controle) e de adenomiose ($p = 0,03$). A proteína PIWIL2 está super expressa no tecido de adenomiose quando comparada ao controle ($p = 0,0001$), o mesmo padrão ocorre ao comparar endométrio e tecido de adenomiose do grupo adenomiose ($p =$

0,0001) e endométrio do grupo controle e endométrio do grupo adenomiose ($p = 0,0001$). A proteína PIWIL4 não tem diferença significativa com relação a expressão no tecido de adenomiose e o grupo controle ($p = 0,05$). O mesmo padrão de expressão é observado quando se comparam os endométrios da adenomiose e do grupo controle ($p = 0,07$). **Conclusão:** As três proteínas PIWI estão presentes no tecido de pacientes com adenomiose. Os diferentes padrões de expressão das proteínas PIWI sugerem que elas podem estar relacionadas com a fisiopatologia da adenomiose.

Palavras-chave: Adenomiose. Histerectomia. Reprodução Humana. Proteínas PIWI.

ABSTRACT

Introduction: Adenomyosis is a benign pathology that has outcomes in women in reproductive age and is defined by endometrium invasion in the myometrium, and may be related to pain and worsening of some reproductive outcomes. To occur this invasion, a series of cellular activities are needed such as growing/division, cellular division in hostile environment, cellular migration and survival. The proteins called P-element-induced wimpy testis (PIWI) are responsible for transposable elements regulation, and have already been described in different types of cancer, including endometrial and ovarian cancer, acting in tumoral cells survival, division and migration. However, they have never been studied in women with adenomyosis. **Objective:** Identify the presence and relationship between PIWI proteins in hysterectomy tissue samples with diffuse adenomyosis diagnosis. **Materials and Methods:** We performed a cross-sectional study. 72 participants were divided into two groups, control (n = 36) and adenomyosis (n = 36). The specimens were obtained through the Surgical Pathology Service from HCPA. Patients' data were obtained by medical records analysis. The identification of PIWI proteins was performed by immunohistochemistry technique with anti-PIWI antibodies, anti-PIWIL 1, anti-PIWIL 2 and anti-PIWIL 4, and a conjugated secondary antibody. The evaluation of protein expression was performed by a quantitative analysis using the ImageJ software and the digital histological score (DHSCORE) and a qualitative analysis by the identification of the expression by the pathologist. In this stage, the normal endometrium from the control group, the eutopic endometrium and ectopic endometrium from the adenomyosis group were analysed. For categorical variables, the *Chi-squared* test was performed, for continuous variables, the Student's *t-test* and *ANOVA* or the *Mann-Whitney* and *Kruskal-Wallis*

tests were performed, according to the distribution of the data, the significance level adopted was 5%. **Results:** The participants had a mean age of 44.28 ± 5.76 years old and 45.81 ± 4.86 years old in the control and adenomyosis groups, respectively ($p \geq 0.05$). Regarding the body mass index, the control group had a mean of 28.07 ± 4.98 kg/m² and the adenomyosis group has a mean of 28.31 ± 3.94 kg/m² ($p \geq 0.05$). The participants of the study had a mean age of 12.75 ± 1.87 years old and 12.86 ± 1.98 years old when the menarche occurred in the control and adenomyosis groups, respectively ($p \geq 0.05$). All the participants were in the menacme. The control group showed a median of 2.50 [2.00 – 4.00] gestations and the adenomyosis group showed a median of 3.00 [2.00 – 3.75] gestations ($p \geq 0.05$). 77.8% (n = 28) of the participants from the control group did not had na abortion, in the adenomyosis group, 74.3% (n = 26) of the participants did not had na abortion ($p \geq 0.05$). Regarding the smoke habits, in the control group, 51.5% (n = 17) of the participants declared not to smoke, 30.3 % (n = 10) has declared themselves as smokers and 18.2% (n = 6) used to smoke. In the adenomyosis group, 66.4% (n = 24) of the participants declared not to smoke, 16.7% (n = 6) has declared themselves as smokers and 16.7% (n = 6) used to smoke ($p \geq 0.05$). The evaluation of protein expression analysed the normal endometrium of the control group and from the adenomyosis group, were analysed the eutopic endometrium and the ectopic endometrium. PIWIL1 presented a reduced expression when compared the ectopic endometrium (adenomyosis tissue) and the normal endometrium from the control group ($p = 0.003$). The same pattern was observed when compared the endometrium from the adenomiosys group ($p = 0.0001$) and compared the normal endometrium (control group) with the eutopic endometrium (adenomyosis group) ($p = 0.03$). The PIWIL2 protein is overexpressed at the ectopic endometrium from adenomyosis group when compared to the control group ($p = 0.0001$), the same

pattern occurs when compared the adenomyosis group, the eutopic and ectopic endometrium ($p = 0.0001$) and compare the eutopic endometrium from the control and the adenomyosis groups ($p = 0.0001$). The PIWIL4 showed no statistical difference regarding its expression in the adenomyosis tissue and the control group ($p = 0.05$). The same expression pattern can be observed when comparing the eutopic endometrium from adenomyosis and control groups ($p = 0.07$). **Conclusion:** The three PIWI proteins investigated are present in the tissue samples from women with adenomyosis. The different patterns of expression of the PIWI proteins suggests that they might be related to the pathophysiology of the adenomyosis.

Keywords: Adenomyosis. Hysterectomy. Human Reproduction. PIWI proteins.

1 INTRODUÇÃO

A adenomiose é uma patologia benigna que acomete mulheres em idade fértil (GARAVAGLIA et al., 2015). Essa doença é caracterizada pela invasão do endométrio no miométrio (BENAGIANO; HABIBA; BROSENS, 2012; BERGERON; AMANT; FERENCZY, 2006). Cerca de um terço dos casos de adenomiose são assintomáticos e, portanto, somente são descobertos através de exames de imagem de rotina. Nos casos em que a adenomiose apresenta sintomas, sendo os mais frequentes, dismenorreia, metrorragia e dor, eles podem ser tratados com a utilização de anti-inflamatórios, anticoncepcionais orais ou com intervenção cirúrgica, com a remoção dos focos ou a retirada do útero quando a adenomiose for disseminada. Neste caso, deve-se levar em conta o desejo de gestação da paciente.

Inicialmente, a adenomiose era considerada uma patologia exclusiva de mulheres com mais de 40 anos de idade e multíparas, porém, com o advento da reprodução assistida e a investigação realizada a fim de descobrir as causas da infertilidade das pacientes que buscam esses recursos, foi possível identificar a presença da adenomiose em pacientes em idade fértil (GARAVAGLIA et al., 2015). Ainda assim, a fisiopatologia da adenomiose continua sendo objeto de estudo de diversos pesquisadores, uma vez que a disponibilidade de dados sobre a adenomiose e a infertilidade é escassa, alguns estudos demonstram que a adenomiose pode acarretar em dificuldade de implantação do embrião e aumento de abortos espontâneos (BARRIER et al., 2004).

Diversas modificações e sinalizações celulares são necessárias para que a adenomiose ocorra. De maneira geral, o epitélio glandular e estroma que compõem o endométrio precisam ultrapassar a zona juncional, promover migração celular,

proliferação e divisão celular em um ambiente hostil, sobrevivência e resposta imune ao miométrio (CARRARELLI et al., 2015; ZHOU et al., 2012). Embora diferentes estudos indiquem uma série de anormalidades celulares, abre-se a perspectiva do estudo das proteínas PIWI, até agora inéditas, no estudo da adenomiose.

Com o intuito de auxiliar na compreensão dos mecanismos que envolvem a fisiopatologia da adenomiose, este trabalho busca compreender se existe uma relação entre esta patologia e as proteínas PIWI. Até o momento, não se tem registro na literatura de pesquisas com esse objetivo, porém, por se tratar de uma invasão de células do endométrio na camada muscular uterina, e as proteínas PIWI estarem envolvidas na sobrevivência, divisão e migração de células tumorais (MOYANO; STEFANI, 2015; WANG et al., 2016), a busca pela compreensão de como ocorre a invasão do endométrio se faz válida.

As proteínas PIWI apresentam papel central nos processos de silenciamento de transposons e são encontradas nas linhagens celulares germinativas. Já foram descritas em diversos tipos de câncer de linhagens germinativas e somáticas, tais como em seminomas e mielomas múltiplos, por exemplo (QIAO et al., 2002; YAN et al., 2015). Esse estudo busca auxiliar na compreensão do funcionamento das proteínas PIWI, assim como na compreensão da fisiopatologia da adenomiose.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PROBLEMA DE PESQUISA

O problema de pesquisa utilizado para a realização desta revisão da literatura foi: “Existe relação entre a adenomiose e as proteínas PIWI?”.

2.2 MÉTODOS

A revisão segue as recomendações propostas pela colaboração *Cochrane* para revisões sistemáticas da literatura.

2.3 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Os critérios para aceitar os artigos foram estabelecidos de acordo com o problema de pesquisa. A fim de que ele fosse respondido, o artigo selecionado deveria ter diagnóstico positivo para adenomiose e ter a presença das proteínas PIWI.

2.4 ESTRATÉGIA DE BUSCA

Os artigos foram pesquisados em quatro diferentes bases de dados: PubMed/MedLine, EmBase, Lilacs/Bireme e ScieLO. Não foram utilizados filtros de ano de publicação e de idioma. Em cada base pesquisada, foram realizadas pesquisas baseadas em *queries*, no qual palavras-chave e termos são inseridos no sistema e pesquisados, sozinhos e em conjunto. Cada base de dados apresenta um sistema diferente, mas todos permitem que a busca seja realizada. A partir dos resultados, faz-se uma lista no gerenciador de referências e faz-se a seleção dos artigos encontrados. Neste estudo, foi utilizado o software *Mendeley – Reference Management* (Elsevier, Holanda). Para esta revisão foram utilizadas as seguintes palavras-chave: *PIWI protein, PIWI proteins, protein expression, gene expression, rtPCR, qPCR, real time*

polymerase chain reaction, reverse transcription polymerase chain reaction, adenomyosis, hysterectomy, immunohistochemistry, women, female e protein analysis.

2.5 SELEÇÃO DOS ESTUDOS E EXTRAÇÃO DOS DADOS

Os artigos foram selecionados baseando-se no problema de pesquisa. Inicialmente foi feita a leitura do título e/ou resumo de cada artigo encontrado através da estratégia de busca estipulada com a presença das palavras-chave adenomiose e/ou proteínas PIWI. Os estudos que não se enquadraram na leitura inicial foram descartados.

A segunda etapa de seleção dos artigos consistiu na eliminação de artigos duplicados que foram selecionados, tendo em vista que eles podem ser encontrados em mais de uma base de dados. Posteriormente, foi realizada a leitura dos estudos na íntegra e aqueles que satisfizeram os critérios de seleção em sua totalidade e/ou parcialidade foram incluídos. Buscas ativas com artigos que poderiam enriquecer esta dissertação também foram realizadas.

2.6 RESULTADOS

Os artigos para esta revisão da literatura foram pesquisados em quatro bases de dados distintas. Cada uma delas apresenta um software de pesquisa diferente, porém, as buscas são realizadas de maneira similar. Inicialmente foram pesquisadas palavras-chave, tanto o termo livre no texto como também “termo de assunto médico”, em inglês *Medical Subject Headings (MeSH terms)*. Posteriormente foi-se realizando a busca pela combinação entre as palavras-chave com a utilização dos operadores booleanos: *and* e/ou *or*. Atualizações nos resultados encontrados também foram realizadas. A primeira pesquisa foi realizada no dia 07 de julho de 2017, atualizações

nos dias 23 de novembro de 2017, 16 de fevereiro de 2018, 25 de maio de 2018 e 10 de setembro de 2018.

Tendo em vista que a procura de estudos que englobasse totalmente os critérios de elegibilidade não encontrou artigos, a busca por estudos que pudessem embasar esta dissertação foi realizada com artigos que preenchiam parcialmente os critérios estabelecidos.

Através da utilização de diferentes palavras-chave que caracterizam o objeto de estudo deste trabalho, assim como das técnicas realizadas durante o desenvolvimento do projeto, foi possível identificar artigos que justificam e embasam a realização desta pesquisa.

As plataformas PubMed/MedLine, EmBase, Lilacs/Bireme e ScieLO foram pesquisadas. No total, foram encontrados 902 artigos. Após a primeira leitura do título e/ou resumo, restaram 258 artigos (Tabela 1). Posteriormente foram excluídos 21 artigos repetidos nas plataformas PubMed/MedLine e EmBase e realizada a leitura na íntegra dos 237 estudos, resultando em 90 artigos selecionados.

Tabela 1 – Revisão da literatura em quatro bases de dados com base na leitura do título e resumo

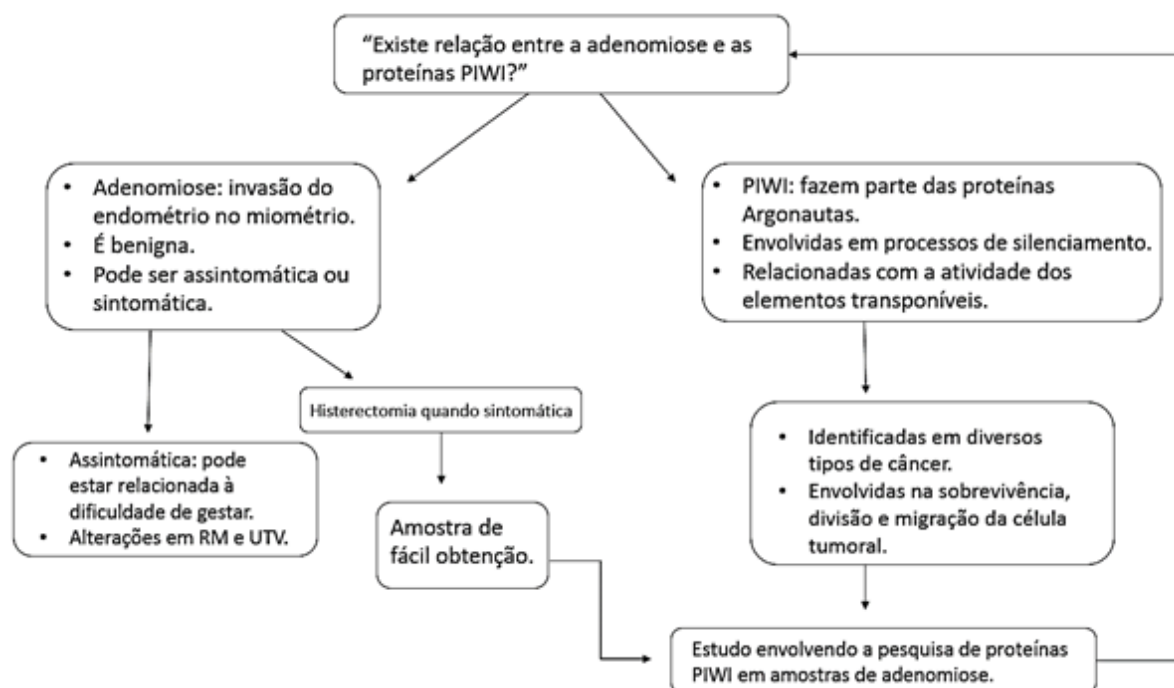
Base de dados	Query	Título e resumo		
		N°aen	N°ael	N°as
PubMed MedLine (611)	((((((((((PIWI protein) OR PIWI proteins) OR "PIWI protein") OR "PIWI proteins")) AND (((immunohistochemistry) OR protein expressions) OR "protein expressions") OR "protein expression") OR protein expression))) AND (((((((((((gene expression) OR "gene expression") OR rtPCR) OR "rtPCR") OR qPCR) OR qPCR) OR "qPCR") OR real time polymerase chain reaction) OR "real time polymerase chain reaction")))) AND (((adenomyosis) AND hysterectomy) AND (((immunohistochemistry) OR protein expressions) OR "protein expressions") OR "protein expression") OR "protein expression")) AND (((("women") OR women) OR women[MeSH Terms]))			
	((((((((((PIWI protein) OR PIWI proteins) OR "PIWI protein") OR "PIWI proteins")) AND (((immunohistochemistry) OR protein expressions) OR "protein expressions") OR "protein expression") OR protein expression))) AND (((((((((((gene expression) OR "gene expression") OR rtPCR) OR "rtPCR") OR qPCR) OR qPCR) OR "qPCR") OR real time polymerase chain reaction) OR "real time polymerase chain reaction"))))	611	447	182
	((((adenomyosis) AND hysterectomy) AND (((immunohistochemistry) OR protein expressions) OR "protein expressions") OR "protein expression") OR "protein expression")) AND (((("women") OR women) OR women[MeSH Terms]))			
Embase (146)	((((((((((PIWI protein) OR PIWI proteins) OR "PIWI protein") OR "PIWI proteins")) AND (((immunohistochemistry) OR protein expressions) OR "protein expressions") OR "protein expression") OR protein expression))) AND (((((((((((gene expression) OR "gene expression") OR rtPCR) OR "rtPCR") OR qPCR) OR qPCR) OR "qPCR") OR real time polymerase chain reaction) OR "real time polymerase chain reaction")))) AND (((("women") OR women) OR women[MeSH Terms]))			
	'adenomyosis'/exp OR adenomyosis AND ('hysterectomy'/exp OR hysterectomy) AND ('female'/exp OR 'female') AND ('piwi protein'/exp OR 'piwi protein') AND ('gene expression'/exp OR 'gene expression') AND ('immunohistochemistry'/exp OR 'immunohistochemistry' OR 'protein expression'/exp OR 'protein expression' OR ('protein'/exp OR protein AND expressions) OR ('protein'/exp OR protein AND 'expression'/exp OR expression) AND ('analysis'/exp OR analysis))			
	'piwi protein'/exp OR 'piwi protein' AND ('gene expression'/exp OR 'gene expression') AND ('real time polymerase chain reaction'/exp OR 'real time polymerase chain reaction' OR (reverse AND 'transcriptase'/exp OR transcriptase) AND ('polymerase'/exp OR polymerase) AND chain AND ('reaction'/exp OR reaction)) OR 'reverse transcription polymerase chain reaction'/exp OR 'reverse transcription polymerase chain reaction')	146	88	72
SciELO (39)	'female'/exp OR 'female' AND ('piwi protein'/exp OR 'piwi protein') AND ('gene expression'/exp OR 'gene expression') AND ('real time polymerase chain reaction'/exp OR 'real time polymerase chain reaction' OR (reverse AND ('transcriptase'/exp OR transcriptase) AND ('polymerase'/exp OR polymerase) AND chain AND ('reaction'/exp OR reaction)) OR 'reverse transcription polymerase chain reaction'/exp OR 'reverse transcription polymerase chain reaction') AND ('immunohistochemistry'/exp OR 'immunohistochemistry' OR 'protein expression'/exp OR 'protein expression' OR ('protein'/exp OR protein AND expressions) OR ('protein'/exp OR protein AND 'expression'/exp OR expression) AND ('analysis'/exp OR analysis))			
	'female'/exp OR 'female' AND ('piwi protein'/exp OR 'piwi protein') (adenomyosis AND hysterectomy AND women AND RNA small silencing AND gene expression. AND reverse transcriptase polymerase chain reaction AND real time polymerase chain reaction AND immunohistochemistry AND protein expression. AND protein expressions)			
	(adenomyosis AND hysterectomy AND women) (RNA small silencing) (gene expression. AND reverse transcriptase polymerase chain reaction AND real time polymerase chain reaction) (immunohistochemistry AND protein expression. AND protein expressions)	38	37	1

Lilacs Bireme (109)	(tw:(piwi protein)) AND (tw:(gene expression)) AND (tw:(reverse transcriptase polymerase chain reaction)) AND (tw:(real time polymerase chain reaction)) AND (tw:(protein expression)) AND (tw:(immunohistochemistry)) AND (tw:(adenomyosis)) AND (tw:(hysterectomy)) AND (tw:(women))	107	104	3
	(tw:(adenomyosis)) AND (tw:(hysterectomy)) AND (tw:(women))			
	(tw:(piwi protein)) AND (tw:(reverse transcriptase polymerase chain reaction)) AND (tw:(real time polymerase chain reaction)) AND (tw:(gene expression)) AND (tw:(immunohistochemistry)) AND (tw:(protein expression))			
Total		902	676	258

Legenda: N°aen: número de artigos encontrados; N°ael: número de artigos eliminados; N°as: número de artigos selecionados.

2.7 MAPA CONCEITUAL

Figura 1 – Representação esquemática do Mapa Conceitual



Representação esquemática do Mapa Conceitual que permeia esta dissertação de mestrado. RM refere-se à ressonância magnética e UTV refere-se à ultrassonografia transvaginal. Fonte: da autora

2.8 ADENOMIOSE

2.8.1 Características gerais

A adenomiose é uma patologia benigna que afeta mulheres em idade fértil (GARAVAGLIA et al., 2015). Esta doença pode se apresentar de duas formas: focal, onde um nódulo delimitado é visível, também chamado de adenomioma; ou difusa, onde uma porção maior do miométrio se encontra acometida pela adenomiose (VANNUCCINI et al., 2017). Sua etiologia é incerta e diferentes autores propuseram ao longo do desenvolvimento de suas pesquisas, três teorias com relação a sua origem (BENAGIANO; HABIBA; BROSENS, 2012; BERGERON; AMANT; FERENCZY, 2006; MATSUMOTO et al., 1999; TAYLOR et al., 1990). Dentre essas

teorias, a mais aceita entre os pesquisadores e especialistas da área é de que a adenomiose é uma doença que caracteriza-se pela invasão de células do endométrio na camada muscular uterina (BENAGIANO; BROSENS; HABIBA, 2015; BERGERON; AMANT; FERENCZY, 2006) (Figura 2). Essa invasão tecidual acarreta em um aumento uterino e na presença de tecido endometrial ectópico cercado pelo miométrio hipertrófico e hiperplásico (BENAGIANO; BROSENS; HABIBA, 2015; BIRD; MCELIN; MANALO-ESTRELLA, 1972). De acordo com Bergeron e colaboradores (2006), a invasão endometrial pode ocorrer devido à ação de enzimas específicas que reduzem a coesão tecidual das fibras musculares que compõem o miométrio. Essa entrada de células endometriais é facilitada também, pela proximidade entre o endométrio e o miométrio, denominada *endometrial-myometrial interface* (EMI, em inglês) dessa forma, as células musculares e endometriais estão em contato direto (DEVLIEGER; D'HOOGE; TIMMERMAN, 2003; UDUWELA et al., 2000). Segundo o estudo de Khan e colaboradores (2016), existem diferenças biológicas entre o endométrio funcional e o endométrio basal de pacientes com e sem adenomiose. Esses pesquisadores conseguiram determinar os padrões de expressão dos receptores de estrogênio e progesterona no tecido endometrial e sugerem que o endométrio basal – que apresenta baixa expressão dos dois receptores – está sob constante estresse devido às alterações cíclicas do endométrio funcional e, portanto, suas células e estroma estão mais propensas a migrarem para o miométrio.

Figura 2 – Ilustração da adenomiose no miométrio



Desenho esquemático representando um útero com adenomiose focal com o objetivo de ilustrar a localização da adenomiose na camada muscular uterina. Fonte: adaptado de <http://www.tuasaude.com/adenomiose>

Em 2004, Oehler e colaboradores já investigavam a expressão dos receptores de estrogênio em pacientes com adenomiose. Segundo os pesquisadores, uma possível explicação para a pouca resposta ao tratamento hormonal da adenomiose deve-se ao fato de ocorrerem mutações nas proteínas que compõem esses receptores.

Outra linha de pesquisa envolvendo a etiologia da adenomiose investiga se a existência de lesões prévias no miométrio favorece a invasão tecidual. De maneira geral, os pesquisadores ainda não conseguiram estabelecer uma relação causal entre o desenvolvimento da adenomiose e a realização de procedimentos de curetagem em mulheres grávidas, por exemplo (CURTIS et al., 2002). De acordo com Curtis e colaboradores, a existência de lesões que interrompem a continuidade da EMI favorecem a implantação, incorporação e sobrevivência do endométrio. Todavia, em ratos C57/BL6J, Mehaseb e colaboradores (2010) identificaram que uma injúria no miométrio não acarretará necessariamente no desenvolvimento da adenomiose. De

fato, em 2001, Bergholt e colaboradores já haviam descrito que cesáreas prévias e curetagens não apresentam associação significativa com a adenomiose.

Os primeiros estudos envolvendo a adenomiose não faziam distinção entre esta patologia e a endometriose. De fato, elas eram comumente confundidas ou então dizia-se que eram formas diferentes da mesma doença. Desde a metade do século XIX já se sabe que estas duas patologias são distintas, com características específicas e etiologias diferentes, entretanto, os sintomas relatados pelas pacientes não são específicos (HABIBA; BENAGIANO, 2015). Na verdade, a incidência de mulheres que são afetadas concomitantemente com adenomiose e endometriose é elevada, porém, não existe consenso com relação a essa informação (BENAGIANO; BROSENS; HABIBA, 2014). Em uma revisão sistemática realizada por Benagiano e colaboradores (2014), os autores reuniram diversas publicações sobre as duas patologias e apresentaram as características que diferenciam a adenomiose da endometriose com relação ao endométrio, fatores imunológicos, proliferação celular e apoptose, mediadores inflamatórios e a atividade dos hormônios esteroides, auxiliando ainda mais na compreensão dos mecanismos de funcionamento dessas patologias.

Inicialmente, quando a adenomiose passou a ser objeto de estudo dos pesquisadores, acreditava-se que essa patologia acometia pacientes com idade entre 40 e 50 anos e multíparas que apresentavam menorragia¹, dismenorreia², metrorragia³, dispareunia⁴ e disquezia⁵ (DEVLIEGER; D'HOOGHE; TIMMERMAN, 2003). Com o advento das técnicas de fertilização *in vitro* e a reprodução assistida, viu-se que a adenomiose pode se manifestar durante a idade reprodutiva da mulher,

¹ Fluxo menstrual intenso.

² Cólicas prévias ou durante a menstruação.

³ Sangramento uterino que ocorre noutro momento que não a menstruação.

⁴ Dor durante a relação sexual.

⁵ Dor ao defecar.

inclusive sendo uma das possíveis causas de dificuldade em engravidar encontrada pelos pacientes que procuram a reprodução assistida (BARRIER et al., 2004). A utilização de técnicas de imagem não invasivas, tais como a ecografia transvaginal, ressonância magnética (RM) e ultrassonografia uterina (US), permitiram uma facilidade maior na identificação e diagnóstico de adenomiose nas pacientes com dificuldade de engravidar e que são assintomáticas para essa patologia (GARAVAGLIA et al., 2015).

De fato, cerca de um terço dos casos de adenomiose relatados são assintomáticos (BERGERON; AMANT; FERENCZY, 2006; GARAVAGLIA et al., 2015), dessa forma, as pacientes descobrem a doença de duas formas: por exames de imagem ditos “de rotina”, em que a adenomiose é diagnosticada, ou em decorrência de uma histerectomia por outras razões médicas em que o diagnóstico é realizado pela análise histológica da peça anatômica, indicando a presença de adenomiose (BENAGIANO; BROSENS; HABIBA, 2015). O diagnóstico de adenomiose é difícil e variável dependendo dos critérios utilizados pelo patologista. De acordo com Uduwela e colaboradores (2000), a maioria dos patologistas só confirma o diagnóstico de adenomiose se a extensão glandular abaixo da EMI – zona juncional (ZJ) em português - for superior à 2,5 mm. Por se tratar de uma patologia benigna, o tratamento da adenomiose normalmente é realizado com a utilização de medicamentos.

Mais comumente são utilizados fármacos anti-inflamatórios para controle dos sintomas que provocam dor ou ainda se faz uso de contraceptivos orais com o objetivo de interromper a menstruação, principalmente progestágenos tendo em vista a relação entre a adenomiose e o hiperestrogenismo local, dessa forma, o estímulo para o desenvolvimento e posterior descamação do endométrio durante o ciclo menstrual

é cessada (ORAZOV et al., 2016; RÖMER, 2018; VANNUCCINI et al., 2017). De maneira geral, o uso de agonistas dos hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRHa) é realizado porque acarretam em hipoestrogenismo local e sistêmico (VANNUCCINI et al., 2018). Os GnRHas também atuam na adenomiose ao induzirem a apoptose, reduzirem a inflamação e a angiogênese (KHAN et al., 2010). Todavia, os efeitos colaterais do uso de GnRHas envolvem a redução da densidade mineral óssea, síndrome vasomotora, atrofia genital e humor instável e, portanto, sua utilização deve ser feita por pacientes não responsivas a outras modalidades de tratamento ou por aquelas que são consideradas pacientes de alto risco para histerectomia (STREULI et al., 2014).

Uma alternativa para os GnRHas é a utilização de progestágenos como o Dienogest tendo em vista que eles são capazes de inibir o fator de crescimento vascular endotelial via hipoestrogenismo e como consequência, reduzem dor e sangramento (OKADA et al., 2011). O Dienogest é um progestágeno com alta seletividade para os receptores de progesterona. Ele atua na inibição da proliferação celular da adenomiose através da indução de vias de apoptose, tem ação antiproliferativa no endométrio, tem baixos efeitos hipoestrogênicos e causa inibição da função ovariana (SASAGAWA et al., 2008; YAMANAKA et al., 2014).

Para as pacientes em que as intervenções farmacológicas não diminuem os sintomas da adenomiose, é indicada intervenção cirúrgica para a remoção dos focos presentes no miométrio, ou ainda, nos casos em que a adenomiose é difusa, a histerectomia. Nesses casos, precisa-se levar em consideração a vontade da paciente em gestar no futuro.

2.8.2 Papel da adenomiose na infertilidade

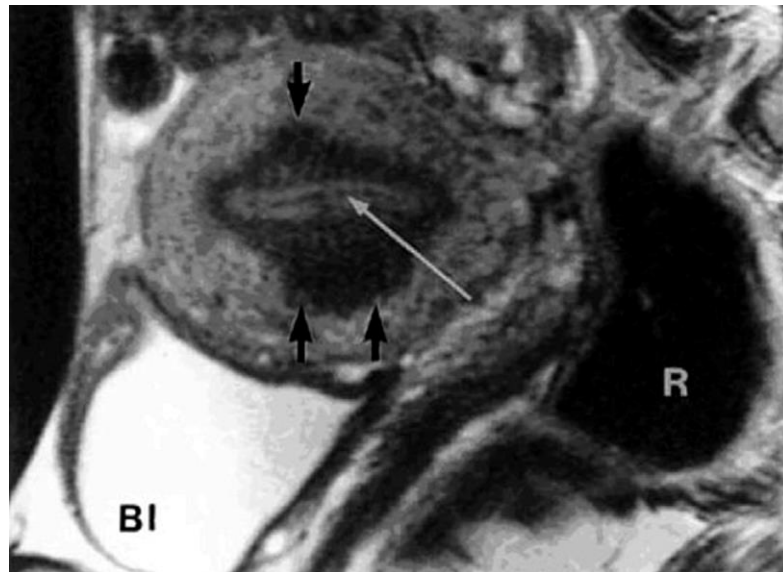
A relação entre a adenomiose e a infertilidade feminina ainda é bastante controversa e não está totalmente elucidada e, por essa razão, continua sendo alvo de pesquisas que tem como objetivo auxiliar na compreensão das consequências desta patologia. Segundo Campo e colaboradores (2012), a dificuldade de compreensão dessa relação é respaldada pela maneira como essa patologia foi estudada nos últimos 20 anos, visto que, os dados obtidos na época somente diziam respeito a forma mais agressiva da adenomiose que necessita a remoção do útero, dessa forma, a avaliação da incidência da adenomiose na população em geral foi prejudicada. Porém, com a utilização de exames de imagem não invasivos, a identificação e caracterização da adenomiose ficou mais fácil, permitindo determinar que essa patologia pode acometer pacientes em idade reprodutiva e que a dificuldade de engravidar de algumas delas pode estar associada à adenomiose (BARRIER et al., 2004).

Apesar de a disponibilidade de dados ser reduzida, a adenomiose e a infertilidade são cada vez mais objeto de estudo e têm modificado o panorama geral. Em 2004, Lesny e Killick conseguiram observar que, em pacientes que realizaram ciclos de fertilização *in vitro* e tinham um espessamento da zona juncional (ZJ) prévio a transferência do embrião, ocorreu um número reduzido de gestações e um aumento de gestações ectópicas. Já em 2005, Piver observou que o espessamento da ZJ tem relação com o aumento de casos de falhas de implantação do embrião. Segundo o pesquisador, a taxa de gravidez por transferência foi maior quando a ZJ apresentava pouco espessamento na RM (Figura 3). Com uma ZJ inferior a 10 mm, as taxas de gravidez foram de 45%, diferentemente de quando a ZJ variava entre 10 mm e 12 mm ou superior a 12 mm, nesses casos, as taxas de gravidez foram de 16% e 5%,

respectivamente, dessa forma, Piver afirma que a avaliação do espessamento da ZJ através de imagens de RM em pacientes que foram submetidas a ciclos de fertilização *in vitro* é o melhor fator preditivo negativo quando se trata de falhas de implantação.

Tremellen e colaboradores (2012) identificaram um aumento da densidade de macrófagos e de células *natural killers* (NK) na adenomiose difusa quando comparadas com pacientes com adenomiose leve ou sem essa patologia. Segundo os pesquisadores, a presença dessas células do sistema imunológico no miométrio pode estar relacionada com a infertilidade por dificultar a nidação do embrião. Em 2016, Sofic e colaboradores conduziram um estudo em que comparavam o espessamento da ZJ em mulheres com (n = 82) e sem adenomiose (n = 82) através de RM, visto que a ZJ desempenha um papel importante durante o ciclo reprodutivo da mulher. Em seu estudo, os autores puderam observar que a ZJ das pacientes com adenomiose estavam significativamente mais espessas do que as pacientes sem adenomiose. Enquanto que a média de espessamento da ZJ do grupo controle foi de 5,6 mm, no grupo com adenomiose a média foi de 14,3 mm. Benagiano e colaboradores (2014) realizaram uma metanálise sobre características do endométrio de pacientes com adenomiose e endometriose. Especificamente com relação a adenomiose, os autores observaram que mulheres com adenomiose apresentam pior prognóstico reprodutivo. De acordo com Thalluri and Tremellen (2012), pacientes com adenomiose apresentam redução nos índices de gestações viáveis; Segundo Salim e colaboradores (2012), mulheres com adenomiose apresentam maiores índices de aborto e redução dos índices de gestação clínica; Martínez-Conejero e colaboradores (2011) observaram redução nos índices de gestação a termo das mulheres com adenomiose.

Figura 3 – Identificação da adenomiose em imagem de ressonância magnética



Identificação de adenomiose através de imagem obtida por RM em T2. Setas pretas curtas identificam o espessamento focal da ZJ enquanto que a seta branca comprida identifica o sangue de menstruação presente na cavidade endometrial. A sigla Bl identifica a bexiga (*bladder* em inglês) e a sigla R identifica o reto (*rectum* em inglês). Fonte: adaptado de REINHOLD; TAFAZOLI; WANG, (1998).

2.9 PROTEÍNAS PIWI

2.9.1 Nomenclatura

A nomenclatura utilizada para denominar as proteínas PIWI pode variar de acordo com a espécie em que elas estão sendo estudadas (Tabela 2). Respeitando-se as características da espécie, essa escolha do nome fica a cargo dos pesquisadores, manter-se como proteínas PIWI ou referir-se a elas com o nome particular de cada espécie. Neste trabalho, a nomenclatura adotada para as proteínas PIWI de humanos será PIWIL1-4.

Como a proteína PIWI foi descrita pela primeira vez em *D. melanogaster*, todas as proteínas PIWI descobertas e descritas posteriormente fazem referência à esta, estudada por Carmell e colaboradores, em 2002, desta forma, elas levam a letra “L”, correspondente à *like* que significa semelhante, tendo em vista que foram realizadas

análises filogenéticas para que elas fossem identificadas como tal (BAMEZAI; RAWAT; BUSKE, 2012; COX et al., 1998).

Tabela 2 – Nomenclatura das proteínas PIWI particular a cada espécie

Espécie	Clado PIWI
<i>Drosophila melanogaster</i>	PIWI <i>Aubergine</i> (AUB) <i>Argonaute3</i> (Ago3)
<i>Homo sapiens</i>	PIWIL1 ou HIWI PIWIL2 ou HILI PIWIL3 PIWIL4 ou HIWI2
<i>Mus musculus</i>	PIWIL1 ou MIWI PIWIL2 ou MILI PIWIL4 ou MIWI2
<i>Danio rerio</i>	PIWIL1 ou ZIWI PIWIL2 ou ZILI
<i>Xenopus</i> sp.	PIWIL1 ou XIWI PIWIL2 ou WILI

Legenda: nomenclatura das proteínas PIWI de acordo com a espécie. Em *D. melanogaster* são encontradas três proteínas na família PIWI, são elas: PIWI, AUB e Ago3; em *H. sapiens* são encontradas quatro isoformas das proteínas PIWI semelhantes, por análises filogenéticas, à proteína PIWI de *D. melanogaster*, por isso são chamadas “PIWI-like” (M. et al., 2015; SASAKI et al., 2003; W. et al., 2014); em *M. musculus* são encontradas três isoformas das proteínas PIWI semelhantes à proteína PIWI de *D. melanogaster* através de análises filogenéticas (GRIVNA; PYHTILA; LIN, 2006; J.E. et al., 2013; WANG et al., 2015); Em *D. rerio*, conhecido como *zebrafish*, é encontrada uma isoforma da proteína PIWI semelhante à proteína PIWI de *D. melanogaster* através de análises filogenéticas (HOUWING et al., 2007; HOUWING; BEREZIKOV; KETTING, 2008; TAN et al., 2002); Em *Xenopus* sp. São encontradas duas isoformas das proteínas PIWI semelhantes à proteína PIWI de *D. melanogaster* através de análises filogenéticas (LAU et al., 2009; WILCZYNSKA et al., 2009). Fonte: da autora

2.9.2 Características gerais

As proteínas PIWI (*P-element induced wimpy testis*) (EC: 3.1.26) foram descobertas e descritas pela primeira vez por Lin e Spradling (1997), e foram caracterizadas como sendo um gene responsável pela proliferação de células germinativas em *Drosophila melanogaster* enquanto os pesquisadores estudavam

genes responsáveis pela divisão assimétrica dessas células. Sendo objeto de estudo dos anos seguintes, em 1998, Cox e colaboradores descobriram que esse gene era responsável por codificar uma proteína extremamente conservada e em 2002 Carmell e colaboradores descobriram que ela foi a primeira proteína animal-específica pertencente a um clado da família das proteínas Argonautas (AGO) a ser descrita. Com base em análises filogenéticas, Carmell e colaboradores (2002) conseguiram identificar dois cladogramas distintos na família de proteínas AGO. O clado AGO está presente em todos os eucariotos e em alguns procariotos, já o clado PIWI é encontrado quase que exclusivamente no reino animal, exceções foram descritas em alguns eucariotos como *Tetrahymena* sp., um protozoário ciliado não-patogênico. Ainda de acordo com o trabalho de Carmell e colaboradores (2002), as proteínas pertencentes ao clado AGO são comumente citoplasmáticas, de expressão ubíqua e usualmente ligam-se à micro-RNAs (miRNAs) e small interfering-RNAs (siRNAs), que são RNAs não-codificantes de 21 a 22 nucleotídeos, nos animais, essas proteínas estão presentes na regulação pós-transcricional. As proteínas pertencentes ao clado PIWI estão altamente envolvidas na linhagem de células germinativas e ligam-se à *piwi interacting-RNAs* (piRNAs), outro tipo de RNA não codificante de 24 a 31 nucleotídeos (KIM; HAN; SIOMI, 2009).

A família Argonauta apresenta funções centrais nos mecanismos de silenciamento com o auxílio dos RNAs não codificantes que, através do pareamento de bases, direcionam as proteínas ao DNA ou RNA específico, atuando como guias (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009; VAN WOLFSWINKEL, 2014). As proteínas PIWI foram amplamente estudadas ao longo dos anos e diversos estudos já caracterizaram e fundamentaram sua atividade. Essas proteínas estão envolvidas com a regulação da atividade dos transposons, alguns estudos já demonstraram que alterações na

atividade das PIWI pode resultar em um aumento da atividade desses elementos (BRENNECKE et al., 2007; M.S. et al., 2007; VAGIN et al., 2006), demonstrando a sua grande importância para a manutenção da integridade celular e reduzindo a possibilidade de dano causada pela atividade dos transposons. As proteínas PIWI são amplamente encontradas nas linhagens germinativas celulares e nas células tronco adultas, auxiliando na manutenção da capacidade de diferenciação dessas células e na integridade celular. Estudos demonstram que existe um aumento da expressão das proteínas PIWI de ratos em células que foram induzidas a apresentarem atividade pluripotente (*induced pluripotent stem cells*, em inglês), sugerindo um possível silenciamento da atividade dos transposons, ratificando a relevância das proteínas PIWI para a manutenção da viabilidade e integridade celular. (MIKKELSEN et al., 2008).

2.9.3 Aspectos bioquímicos das proteínas PIWI de humanos

As proteínas PIWI apresentam peso molecular que varia de acordo com as suas isoformas. A proteína PIWIL1 pesa 98,603 kDa, a proteína PIWIL2 pesa 109,849 kDa, a proteína PIWIL3 pesa 101,089 kDa e a proteína PIWIL4 pesa 96,589 kDa (UniProt, acesso em 2018). Essas proteínas são compostas por 861, 973, 882 e 852 aminoácidos (aa), respectivamente.

A partir da análise de um alinhamento múltiplo de sequências (MAS, *multiple sequence alignment* em inglês) comparando a proteína PIWI de *D. melanogaster* e as quatro isoformas das proteínas PIWI descritas em humanos, pode-se identificar regiões extremamente conservadas entre as cinco sequências (Figura 4) (DI TOMMASO et al., 2011; NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000). Essa grande similaridade entre as proteínas sugere que essas regiões são importantes para a

atividade proteica e, mesmo entre as diferentes espécies, ela permanece constante (LUO et al., 2010).

Figura 4 - Alinhamento múltiplo de seqüências de proteínas PIWI



Alinhamento múltiplo de sequências realizado na plataforma *t-coffee* com as sequências das proteínas PIWI de *D. melanogaster* e as quatro isoformas das proteínas PIWI de humanos, PIWIL1-4; as sequências de aas das proteínas foram retiradas da plataforma UniProt; (A) e (B) são continuidade do alinhamento; conforme legenda da plataforma *t-coffee*, azul e verde são consideradas regiões ruins do alinhamento – com bastante diferença entre as sequências – amarelo é considerada região com alinhamento médio e rosa é considerada região com bom alinhamento, com sequências iguais e/ou bastante semelhantes; (*) representam letras iguais em todas as proteínas, (:) representam letras bem semelhantes nas sequências, (.) representam pouca semelhança entre as sequências. Fonte: da autora

De maneira geral, as proteínas PIWI são constituídas de dois domínios: o domínio *PIWI/Argonaute/Zwille* (PAZ) e o domínio PIWI, que se encontra na região C-terminal e é composto por 350 resíduos de aminoácidos (ISHIZU; SIOMI; SIOMI, 2012). Segundo dois estudos, de Lingel e colaboradores (2003) e de Yan e colaboradores (2003), o domínio PAZ apresenta o motivo de ligação denominado ligante de oligonucleotídeo/oligosacarídeo (em inglês *oligonucleotide/oligosaccharide binding* - OB) (SONG et al., 2004). Esse domínio é responsável pela ligação da proteína PIWI com o RNA alvo – elementos transponíveis ou sequências repetidas a serem eliminadas – a partir da sua conexão com o OB. Já o domínio PIWI tem estrutura semelhante à enzima RNase H e permanece lateralizado ao domínio PAZ para realizar os cortes no RNA alvo (Figura 5) (PARKER; ROE; BARFORD, 2004; SONG et al., 2003, 2004; THOMSON; LIN, 2009).

Figura 5 - Estrutura das proteínas PIWI

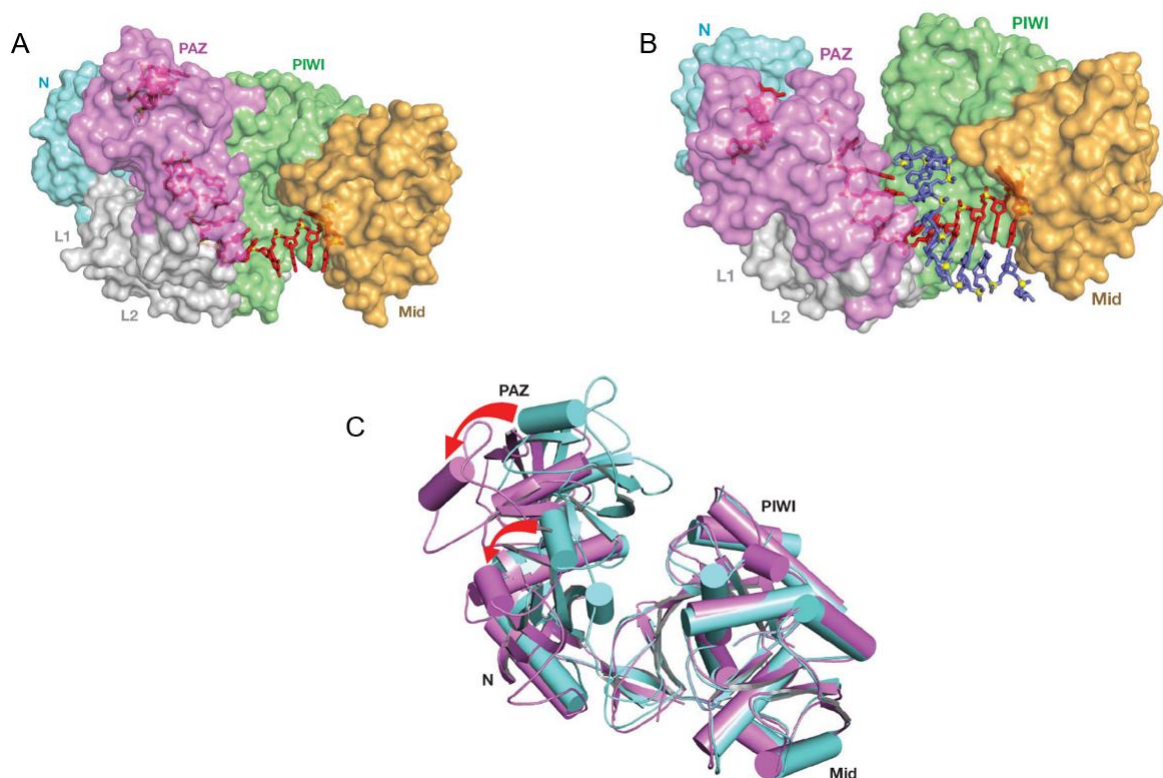


Ilustração da estrutura das proteínas PIWI; (A) estrutura secundária da proteína PIWI expondo o OB para que ocorra a ligação com a molécula alvo; (B) estrutura terciária da proteína PIWI após a ligação

do RNA alvo (em azul); (C) sobreposição das conformações binária (A) e terciária (B) da proteína PIWI, as setas em vermelho indicam a magnitude das mudanças conformacionais sofridas pela proteína após a ligação com o RNA alvo. Fonte: adaptado de Wang e colaboradores (2008)

2.9.4 Envolvimento das proteínas PIWI de humanos com o câncer

Desde sua descoberta, em 1997, as proteínas PIWI vem sendo objeto de estudo de diversos grupos de pesquisa com o intuito de esclarecer cada vez mais as funções, atividades, formas de regulação, comportamento e estrutura dessas proteínas. Já está bastante consolidado no meio científico, a relação entre as PIWI e a atividade dos transposons. De maneira geral, os elementos transponíveis (ETs), também chamados transposons, possuem a capacidade de se locomoverem dentro do genoma e, por consequência, aumentam a capacidade de causar danos (MOYANO; STEFANI, 2015). As proteínas PIWI estão envolvidas no silenciamento dos transposons, auxiliando na manutenção da integridade celular, porém, são necessários mais estudos que permitam elucidar questões que ainda são incertas sobre as proteínas PIWI, como por exemplo, o controle da expressão gênica e o possível envolvimento dessas proteínas no câncer (MOYANO; STEFANI, 2015).

Apesar de as proteínas PIWI serem amplamente expressas nas linhagens germinativas das células, estudos demonstram que elas também estão presentes em diversos tipos de câncer de linhagem germinativa e somática (Tabela 3). Essas proteínas já foram relatadas em seminomas, mielomas múltiplos, câncer de mama, ovariano e endometrial, assim como câncer gastrointestinal e de próstata (LEE et al., 2006; QIAO et al., 2002; YAN et al., 2015; ZHAO et al., 2012), e estão relacionadas com pior prognóstico em casos de adenocarcinoma de pâncreas e glioma, por exemplo (GROCHOLA et al., 2008; SUN et al., 2011). Wang e colaboradores, (2016) conseguiram descobrir que a proteína PIWIL4 é altamente expressa em amostras de pacientes com câncer de mama e em diferentes linhagens celulares. Ao utilizarem

linhagens celulares de câncer de mama triplo-negativo (TNBC, *triple negative breast cancer*, em inglês) MDA-MB-231 como modelo de estudo, os autores demonstraram que a expressão de PIWIL4 promove a sobrevivência, divisão e migração da célula tumoral e ainda, atua nessas células ativando parcialmente a sinalização do fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) e reprimindo o Complexo de Histocompatibilidade de classe II (MHC II). Em 2012, Li e colaboradores estudaram a relação entre a proteína PIWIL2 e o câncer de intestino. Segundo os pesquisadores, essa proteína é altamente expressa no tecido afetado pelo tumor e nas lesões de metástases de linfonodos. Ainda, se correlaciona com parâmetros clínicos mais agressivos, com pior sobrevida e redução do índice de sobrevida após cinco anos sem metástase.

Alguns estudos apontam para a característica marcante das células tumorais de apresentarem similaridade com as células tronco (SIDDIQI; MATUSHANSKY, 2012). Segundo os pesquisadores, essas células tumorais também possuem uma alta capacidade de replicação, divisão e migração celular (Y. et al., 2015). Ainda que bastante promissoras as descobertas relacionando as proteínas PIWI com diversos tipos de câncer, são necessários mais estudos que auxiliem na compreensão dessa relação, possibilitando determinar se as proteínas PIWI encontradas nessas patologias apresentam papéis centrais na carcinogênese ou se são apenas produto da expressão gênica desregulada que ocorre no câncer (MOYANO; STEFANI, 2015).

Tabela 3 - Estudos que identificaram a presença das proteínas PIWI e/ou piRNAs em diversos tipos de câncer

Autores	Tipo de câncer	PIWI encontrada	piRNAs encontrados	Técnicas utilizadas
Al-Janabi e colaboradores (2014)	Carcinoma de células renais	PIWIL1 PIWIL4	-	qPCR
Busch e colaboradores (2015)	Carcinoma de células renais claras	-	piR-30924 piR-57125 piR-38756	RT-qPCR
Cao e colaboradores (2016)	Câncer de mama	PIWIL1 PIWIL2	-	RT-qPCR Western blot
Chen e colaboradores (2013)	Câncer de ovário epitelial	PIWIL1 PIWIL2 PIWIL3 PIWIL4	-	Microarray Imuno-histoquímica
Chen e colaboradores (2015)	Câncer de endométrio tipo I	PIWIL1	-	Imuno-histoquímica Cultura celular RT-qPCR
Chu e colaboradores (2015)	Câncer de bexiga	-	197 piRNAs expressos 106 expressão aumentada 91 expressão reduzida	Microarray RT-qPCR

Cordeiro e colaboradores (2016)	Linfoma de Hodgkin	PIWIL1 PIWIL2 PIWIL4	piRNA-651	Imuno-histoquímica Western blot
Ferreira e colaboradores (2014)	Câncer de testículo Seminomas	PIWIL1 PIWIL2 PIWIL4	piRNA-DQ598918 piRNA-DQ589977 piRNA-DQ601609	RT-qPCR
Fu e colaboradores (2015)	Câncer de mama	-	piR-021285	RT-qPCR
Gainetdinov e colaboradores (2016)	Seminoma	PIWIL1 PIWIL2	-	RT-qPCR
Gambichler e colaboradores (2017)	Melanoma metastático	PIWIL3	-	Imuno-histoquímica
Greither e colaboradores (2012)	Sarcoma de partes moles	PIWIL2 PIWIL4	-	RT-qPCR
Grochola e colaboradores (2008)	Adenocarcinoma de pâncreas	PIWIL1	-	Microdissecção RT-qPCR Imuno-histoquímica

He e colaboradores (2010)	Câncer de colo uterino	PIWIL2	-	Imuno-histoquímica
He e colaboradores (2009)	Câncer de esôfago	PIWIL1	-	Imuno-histoquímica Imunocitoquímica
Krishnan e colaboradores (2017)	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço	PIWIL1	13 piRNAs	Bancos de dados genômicos
Li e colaboradores (2010)	Câncer colorretal	PIWIL1 PIWIL2 PIWIL3 PIWIL4	-	Microarray Imuno-histoquímica
Lim e colaboradores (2014)	Câncer de ovário epitelial	PIWIL1 PIWIL2 PIWIL3 PIWIL4	-	RT-qPCR
Martinez e colaboradores (2016)	Câncer de estômago	-	FR222326 FR290353 FR064000 FR387750 FR157678	Banco de dados genômicos

Navarro e colaboradores (2015)	Câncer de pulmão	PIWIL1 PIWIL2 PIWIL4	-	Imuno-histoquímica
--------------------------------	------------------	----------------------------	---	--------------------

Legenda: Artigos publicados em periódicos indexados que foram incluídos nesta revisão da literatura por apresentarem relevância aos assuntos pesquisados. Os estudos escolhidos para integrarem a tabela foram selecionados de acordo com o ineditismo de suas descobertas, assim como as técnicas utilizadas durante os experimentos e o delineamento dos estudos: transversais, de coorte e casos-controle. Fonte: da autora

2.9.5 Vínculo entre as proteínas PIWI e os piRNAs

A relação existente entre as proteínas PIWI e os piRNAs é de extrema importância. É a partir da ligação entre essas duas moléculas que as PIWI são direcionadas ao DNA ou RNA a ser silenciado (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009; VAN WOLFSWINKEL, 2014). Tendo em vista que a grande maioria dos piRNAs contem sequências de ETs, é através da atividade conjunta dessas moléculas que os ETs são silenciados e, portanto, não causam danos ao material genético (DI GIACOMO et al., 2013).

O elo entre as proteínas PIWI e os piRNAs é tamanho que elas participam inclusive da síntese dos piRNAs (GUNAWARDANE et al., 2007). A formação dos piRNAs ditos maduros ocorre a partir de duas vias, a primeira delas tem início após a síntese de um RNA precursor que é transcrito de ETs e/ou grandes grupos de piRNAs (piRNAs *clusters*, em inglês) que dá origem aos piRNAs precursores. Eles se ligam às proteínas PIWI e fazem uso dessa maquinaria para que seu processamento ocorra; essa via é denominada de processamento primário. A segunda via tem início a partir da definição da terminação 5' dos piRNAs precursores feita pela clivagem a partir da atividade da PIWIL2, que transfere à molécula de piRNA à PIWIL4. Esta proteína, por sua vez, cliva a terminação 5' da fita oposta dos piRNAs precursores e retorna a molécula à PIWIL2. A determinação da extremidade 3' dos piRNAs precursores é realizada pela atividade nucleas de uma proteína desconhecida até o momento e, após, a proteína PIWIL4 parece ser transportada para o núcleo; essa via é denominada de processamento secundário ou ciclo ping-pong (Figura 6) (GUNAWARDANE et al., 2007; KIM; HAN; SIOMI, 2009).

Figura 6 - Síntese dos piRNAs

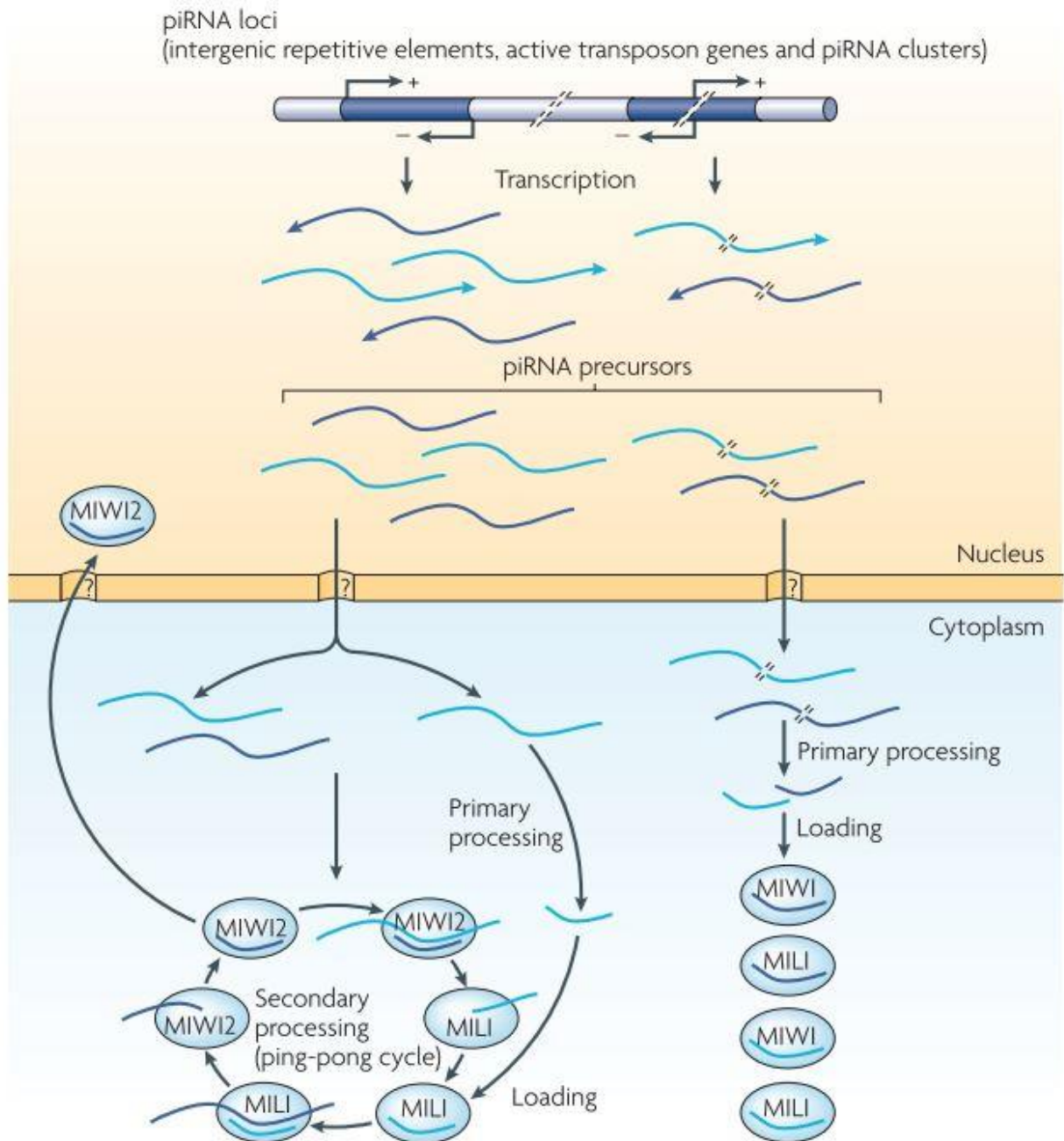


Figura ilustra a formação dos piRNAs maduros através das vias primária e secundária, também denominada ciclo ping-pong em célula de rato (*mice* em inglês); MIWI é a nomenclatura da proteína PIWIL1 de ratos; MILI é a nomenclatura da proteína PIWIL2 de ratos; MIWI2 é a nomenclatura da proteína PIWIL4 de ratos. Fonte: retirado de Kim e colaboradores, (2009)

Le Thomas e colaboradores (2014) analisaram como ocorre a síntese dos piRNAs em *D. melanogaster*. Segundo os pesquisadores, a produção dessas moléculas se dá a partir da herança das regiões onde se localizam os *piRNA clusters*,

local de acúmulo de precursores dos piRNAs. Ainda, de acordo com De Vanssay e colaboradores (2012), basta herdar um fator citoplasmático materno para que ocorra a ativação da geração de *piRNAs clusters* nos embriões sem a necessidade de herdar o *cluster* propriamente dito. Os pesquisadores também descobriram que para a manutenção da fertilidade da prole e do correto silenciamento mediado pelos piRNAs é necessário herdar os piRNAs maternos. Conforme Le Thomas e colaboradores (2014), os piRNAs herdados modificam a estrutura da cromatina dos loci homólogos no núcleo da geração que os herdou, que é essencial para a transcrição dos piRNAs precursores.

A atuação conjunta dos piRNAs e das proteínas PIWI pode também ser observada em diversas publicações em que o alvo de estudo foi a presença dessas moléculas em pacientes diagnosticados com câncer (FERREIRA et al., 2014; KRISHNAN et al., 2017, 2016). Considerando-se que nos tumores a expressão das proteínas PIWI está relacionada com os processos de migração celular, sobrevivência e divisão celular, estudar sua presença na adenomiose se faz necessária.

3 JUSTIFICATIVA

A adenomiose é uma patologia benigna caracterizada pela invasão do endométrio no miométrio que acarreta em hipertrofia e hiperplasia uterina. Ao longo dos anos, diversos pesquisadores propuseram mecanismos de atuação de moléculas, receptores e vias de ativação celular que explicassem a fisiopatologia desta doença. Entretanto, apesar de muito estudada, a fisiopatologia da adenomiose ainda é incerta e mais estudos que auxiliem na compreensão do seu funcionamento a nível celular são necessários.

O objetivo deste trabalho é pesquisar se existe relação entre a adenomiose e as proteínas PIWI. Essas proteínas são responsáveis pelo silenciamento de ETs em linhagens germinativas e nas células tronco adultas, além disso, elas já foram descritas em diversos tipos de câncer, como de ovário e endométrio, em que estão expressas em grande quantidade, podendo atuar promovendo a sobrevivência, divisão e migração das células tumorais.

Tendo em vista a atividade das proteínas PIWI, esse trabalho inédito busca identificar a expressão delas em tecido proveniente de histerectomia com diagnóstico positivo de adenomiose em pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

4 HIPÓTESES

4.1 HIPÓTESE NULA

As proteínas PIWI não apresentam relação com a adenomiose difusa em mulheres submetidas a histerectomia.

4.2 HIPÓTESE ALTERNATIVA

As proteínas PIWI apresentam relação com a adenomiose difusa em mulheres submetidas a histerectomia.

5 OBJETIVOS

5.1 PRINCIPAL

Identificar a presença das proteínas PIWIL1, PIWIL2 e PIWIL4 em tecido proveniente de histerectomia de pacientes com adenomiose.

5.2 SECUNDÁRIOS

- Comparar a expressão da PIWIL1 em endométrio sadio (grupo controle) e em endométrio de mulheres com adenomiose difusa submetidas a histerectomia;
- Comparar a expressão da PIWIL1 em endométrio sadio e em tecido endometrial ectópico (adenomiótico) de mulheres com adenomiose difusa submetidas a histerectomia;
- Comparar a expressão da PIWIL1 em endométrio de mulheres com adenomiose difusa e em tecido endometrial ectópico destas mulheres, submetidas a histerectomia;
- Comparar a expressão da PIWIL2 em endométrio sadio e em endométrio de mulheres com adenomiose difusa submetidas a histerectomia;
- Comparar a expressão da PIWIL2 em endométrio sadio e em tecido endometrial ectópico de mulheres com adenomiose difusa submetidas a histerectomia;
- Comparar a expressão da PIWIL2 em endométrio de mulheres com adenomiose difusa e em tecido endometrial ectópico destas mulheres, submetidas a histerectomia;
- Comparar a expressão da PIWIL4 em endométrio sadio e em endométrio de mulheres com adenomiose difusa submetidas a histerectomia;

- Comparar a expressão da PIWIL4 em endométrio sadio e em tecido endometrial ectópico de mulheres com adenomiose difusa submetidas a histerectomia;
- Comparar a expressão da PIWIL4 em endométrio de mulheres com adenomiose difusa e em tecido endometrial ectópico destas mulheres, submetidas a histerectomia.

REFERÊNCIAS

AL-JANABI, Omar et al. Piwi-like 1 and 4 gene transcript levels are associated with clinicopathological parameters in renal cell carcinomas. **Biochimica et biophysica acta**, Netherlands, v. 1842, n. 5, p. 686–690, 2014.

BAMEZAI, Shiva; RAWAT, Vijay P. S.; BUSKE, Christian. Concise review: The Piwi-piRNA axis: pivotal beyond transposon silencing. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, United States, v. 30, n. 12, p. 2603–2611, 2012.

BARRIER, Breton F. et al. Adenomyosis in the baboon is associated with primary infertility. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 82, n. SUPPL. 3, p. 1091–1094, 2004.

BENAGIANO, Giuseppe; BROSENS, Ivo; HABIBA, Marwan. Structural and molecular features of the endomyometrium in endometriosis and adenomyosis. **Human Reproduction Update**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 386–402, 2014.

BENAGIANO, Giuseppe; BROSENS, Ivo; HABIBA, Marwan. Adenomyosis: A life-cycle approach. **Reproductive BioMedicine Online**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 220–232, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.11.005>>

BENAGIANO, Giuseppe; HABIBA, Marwan; BROSENS, Ivo. The pathophysiology of uterine adenomyosis: An update. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 98, n. 3, p. 572–579, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.044>>

BERGERON, Christine; AMANT, Frederic; FERENCZY, Alex. Pathology and physiopathology of adenomyosis. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 511–21, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16563870>>

BERGHOLT, T. et al. Prevalence and risk factors of adenomyosis at hysterectomy. **Human reproduction (Oxford, England)**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 2418–21, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679531>>

BIRD, C. C.; MCELIN, T. W.; MANALO-ESTRELLA, P. The elusive adenomyosis of the uterus--revisited. **American journal of obstetrics and gynecology**, [s. l.], v. 112, n. 5, p. 583–93, 1972. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5059589>>

BRENNECKE, Julius et al. Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. **Cell**, [s. l.], v. 128, n. 6, p. 1089–1103, 2007.

BUSCH, Jonas et al. Piwi-interacting RNAs as novel prognostic markers in clear cell

renal cell carcinomas. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, England, v. 34, p. 61, 2015.

C., Chen; J., Liu; G., Xu. Overexpression of PIWI proteins in human stage III epithelial ovarian cancer with lymph node metastasis. **Cancer Biomarkers**, G. Xu, Center Laboratory, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201508, China, v. 13, n. 5, p. 315–321, 2013. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L372188154>>

CAMPO, Sebastiano; CAMPO, Vincenzo; BENAGIANO, Giuseppe. Adenomyosis and infertility. **Reproductive BioMedicine Online**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 35–46, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.10.003>>

CAO, Jiwei et al. High expression of piwi-like RNA-mediated gene silencing 1 is associated with poor prognosis via regulating transforming growth factor-beta receptors and cyclin-dependent kinases in breast cancer. **Molecular medicine reports**, Greece, v. 13, n. 3, p. 2829–2835, 2016.

CARMELL, Michelle A. et al. The Argonaute family: Tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Genes and Development**, [s. l.], v. 16, n. 21, p. 2733–2742, 2002.

CARRARELLI, Patrizia et al. Myostatin, follistatin and activin type II receptors are highly expressed in adenomyosis. **Fertility and sterility**, United States, v. 104, n. 3, p. 744–52.e1, 2015.

CHEN, Zheng et al. Piwil1 causes epigenetic alteration of PTEN gene via upregulation of DNA methyltransferase in type I endometrial cancer. **Biochemical and biophysical research communications**, United States, v. 463, n. 4, p. 876–880, 2015.

CHU, Haiyan et al. Identification of novel piRNAs in bladder cancer. **Cancer letters**, Ireland, v. 356, n. 2 Pt B, p. 561–567, 2015.

CONSORTION, UniProt. **UniProt**. 2018. Disponível em: <<https://www.uniprot.org/>>.

CORDEIRO, Anna et al. PiwiRNA-651 as marker of treatment response and survival in classical Hodgkin lymphoma. **Oncotarget**, A. Navarro, Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain, v. 7, n. 29, p. 46002–46013, 2016. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L611516672>>

COX, Daniel N. et al. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi

are essential for stem cell self-renewal. **Genes and Development**, [s. l.], v. 12, n. 23, p. 3715–3727, 1998.

CURTIS, Kathryn M. et al. Disruption of the endometrial-myometrial border during pregnancy as a risk factor for adenomyosis. **American journal of obstetrics and gynecology**, [s. l.], v. 187, n. 3, p. 543–4, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12237624>>

DE VANSSAY, Augustin et al. Paramutation in *Drosophila* linked to emergence of a piRNA-producing locus. **Nature**, [s. l.], v. 490, n. 7418, p. 112–5, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22922650>>

DEVLIEGER, Roland; D'HOOGE, Thomas; TIMMERMAN, Dirk. Uterine adenomyosis in the infertility clinic. **Human Reproduction Update**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 139–147, 2003.

DI GIACOMO, Monica et al. Multiple epigenetic mechanisms and the piRNA pathway enforce LINE1 silencing during adult spermatogenesis. **Molecular cell**, United States, v. 50, n. 4, p. 601–608, 2013.

DI TOMMASO, Paolo et al. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 39, n. Web Server issue, p. W13-7, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21558174>>

FERREIRA, Humberto J. et al. Epigenetic loss of the PIWI/piRNA machinery in human testicular tumorigenesis. **Epigenetics**, United States, v. 9, n. 1, p. 113–118, 2014.

FU, Alan et al. PIWI-interacting RNA 021285 is involved in breast tumorigenesis possibly by remodeling the cancer epigenome. **Carcinogenesis**, England, v. 36, n. 10, p. 1094–1102, 2015.

GAINETDINOV, IV et al. Distinguishing epigenetic features of preneoplastic testis tissues adjacent to seminomas and nonseminomas. **Oncotarget**, I.V. Gainetdinov, Department of Genetics and Postgenomic Technologies, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation, v. 7, n. 16, p. 22439–22447, 2016. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L610276723>>

GAMBICHLER, Thilo et al. Expression of PIWIL3 in primary and metastatic melanoma. **Journal of cancer research and clinical oncology**, Germany, v. 143, n. 3, p. 433–437, 2017.

GARAVAGLIA, E. et al. Adenomyosis and its impact on women fertility. **Iran Journal**

of **Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 327–336, 2015.

GHILDIYAL, Megha; ZAMORE, Phillip D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 94–108, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg2504>>

GREITHER, Thomas et al. Expression of human Piwi-like genes is associated with prognosis for soft tissue sarcoma patients. **BMC cancer**, England, v. 12, p. 272, 2012.

GRIVNA, Shane T.; PYHTILA, Brook; LIN, Haifan. MIWI associates with translational machinery and PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in regulating spermatogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 103, n. 36, p. 13415–13420, 2006.

GROCHOLA, L. F. et al. The stem cell-associated Hiwi gene in human adenocarcinoma of the pancreas: expression and risk of tumour-related death. **British journal of cancer**, [s. l.], v. 99, n. 7, p. 1083–8, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2567072&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

GUNAWARDANE, Lalith S. et al. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 315, n. 5818, p. 1587–90, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17322028>>

HABIBA, Marwan; BENAGIANO, Giuseppe. **Uterine Adenomyosis**. [s.l.] : Springer, 2015.

HE, G. et al. Piwil2 expressed in various stages of cervical neoplasia is a potential complementary marker for p16ink4a. **American Journal of Translational Research**, J.-X. Gao, Department of Pathology, Comprehensive Cancer Center, Ohio State University Medical Center, Columbus, OH, 43210, United States, v. 2, n. 2, p. 156–169, 2010. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L358914256>>

HE, Wei et al. Expression of HIWI in human esophageal squamous cell carcinoma is significantly associated with poorer prognosis. **BMC cancer**, England, v. 9, p. 426, 2009.

HOUWING, Saskia et al. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. **Cell**, [s. l.], v. 129, n. 1, p. 69–82, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17418787>>

HOUWING, Saskia; BEREZIKOV, Eugene; KETTING, René F. Zili is required for

germ cell differentiation and meiosis in zebrafish. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 27, n. 20, p. 2702–11, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18833190>>

ISHIZU, Hirotsugu; SIOMI, Haruhiko; SIOMI, Mikiko C. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. **Genes & development**, United States, v. 26, n. 21, p. 2361–2373, 2012.

J.E., Jacobs et al. Deficiency of MIWI2 (Piwil4) induces mouse erythroleukemia cell differentiation, but has no effect on hematopoiesis in vivo. **PLoS ONE**, David I. K. Martin Children's Hospital Oakland Research Institute, Oakland, CA, United States, v. 8, n. 12, 2013. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L372294815>>

KHAN, Khaleque N. et al. Biological differences between functionalis and basalis endometria in women with and without adenomyosis. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, Ireland, v. 203, p. 49–55, 2016.

KHAN, Khaleque Newaz et al. Changes in tissue inflammation, angiogenesis and apoptosis in endometriosis, adenomyosis and uterine myoma after GnRH agonist therapy. **Human reproduction (Oxford, England)**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 642–53, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20008888>>

KIM, V. Narry; HAN, Jinju; SIOMI, Mikiko C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature reviews. Molecular cell biology**, England, v. 10, n. 2, p. 126–139, 2009.

KRISHNAN, AR et al. Smoking status regulates a novel panel of PIWI-interacting RNAs in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, W.M. Ongkeko, VA Medical Center San Diego, San Diego, United States, v. 65, p. 68–75, 2017. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L613915453>>

KRISHNAN, Preethi et al. Piwi-interacting RNAs and PIWI genes as novel prognostic markers for breast cancer. **Oncotarget**, United States, v. 7, n. 25, p. 37944–37956, 2016.

LAU, Nelson C. et al. Systematic and single cell analysis of Xenopus Piwi-interacting RNAs and Xiwi. **The EMBO journal**, England, v. 28, n. 19, p. 2945–2958, 2009.

LE THOMAS, Adrien et al. Transgenerationally inherited piRNAs trigger piRNA biogenesis by changing the chromatin of piRNA clusters and inducing precursor processing. **Genes & development**, United States, v. 28, n. 15, p. 1667–1680, 2014.

LEE, Jae Ho et al. Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits

apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway. **Human molecular genetics**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 201–11, 2006. Disponível em: <<http://www.hmg.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/hmg/ddi430>>

LESNY, Piotr; KILLICK, Stephen R. The junctional zone of the uterus and its contractions. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, [s. l.], v. 111, n. 11, p. 1182–1189, 2004.

LI, D. et al. Piwil2 modulates the proliferation and metastasis of colon cancer via regulation of matrix metalloproteinase 9 transcriptional activity. **Experimental Biology and Medicine**, Z. Peng, Department of General Surgery, Shanghai Jiaotong University Affiliated First People's Hospital, Shanghai 200080, China, v. 237, n. 10, p. 1231–1240, 2012. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L365964561>>

LI, L. et al. Argonaute proteins: Potential biomarkers for human colon cancer. **BMC Cancer**, H. Gao, Institute of Digestive Disease, Tongji Hospital affiliated to Tongji University, Shanghai, 200065, China, v. 10, 2010. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L50843544>>

LIM, Shu Ly et al. Overexpression of piRNA pathway genes in epithelial ovarian cancer. **PloS one**, United States, v. 9, n. 6, p. e99687, 2014.

LIN, H.; SPRADLING, AC. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the Drosophila ovary. **Development (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 124, n. 12, p. 2463–2476, 1997.

LINGEL, Andreas et al. Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. **Nature**, [s. l.], v. 426, n. 6965, p. 465–9, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14615801>>

LUO, Rong et al. Analysis and characterization of the genes encoding the Dicer and Argonaute proteins of Schistosoma japonicum. **Parasites & vectors**, England, v. 3, p. 90, 2010.

M., Litwin et al. Correlation of HIWI and HILI expression with cancer stem cell markers in colorectal cancer. **Anticancer Research**, M. Litwin, Research Laboratory, Regional Specialist Hospital in Wrocław, Research and Development Centre, Wrocław, Poland, v. 35, n. 6, p. 3317–3324, 2015. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L604939935>>

M.S., Klenov et al. Repeat-associated siRNAs cause chromatin silencing of retrotransposons in the Drosophila melanogaster germline. **Nucleic Acids**

Research, V.A. Gvozdev, Department of Molecular Genetics of Cell, Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow 123182, Russian Federation, v. 35, n. 16, p. 5430–5438, 2007. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L47423917>>

MARTÍNEZ-CONEJERO, José A. et al. Adenomyosis does not affect implantation, but is associated with miscarriage in patients undergoing oocyte donation. **Fertility and sterility**, [s. l.], v. 96, n. 4, p. 943–50, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21821247>>

MARTINEZ, Victor D. et al. An atlas of gastric PIWI-interacting RNA transcriptomes and their utility for identifying signatures of gastric cancer recurrence. **Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association**, Japan, v. 19, n. 2, p. 660–665, 2016.

MATSUMOTO, Y. et al. Apoptosis and Ki-67 expression in adenomyotic lesions and in the corresponding eutopic endometrium. **Obstetrics and gynecology**, [s. l.], v. 94, n. 1, p. 71–7, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10389721>>

MEHASSEB, Mohamed K.; BELL, S. C.; HABIBA, M. A. Neonatal administration of tamoxifen causes disruption of myometrial development but not adenomyosis in the C57/BL6J mouse. **Reproduction (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 139, n. 6, p. 1067–75, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20368191>>

MIKKELSEN, Tarjei S. et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. **Nature**, [s. l.], v. 454, n. 7200, p. 49–55, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature07056>>

MOYANO, Miguel; STEFANI, Giovanni. piRNA involvement in genome stability and human cancer. **Journal of hematology & oncology**, [s. l.], v. 8, p. 38, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4412036&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

NAVARRO, Alfons et al. The significance of PIWI family expression in human lung embryogenesis and non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, United States, v. 6, n. 31, p. 31544–31556, 2015.

NOTREDAME, C.; HIGGINS, D. G.; HERINGA, J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **Journal of molecular biology**, [s. l.], v. 302, n. 1, p. 205–17, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10964570>>

OEHLER, Martin K. et al. Functional characterization of somatic point mutations of the human estrogen receptor alpha (hERalpha) in adenomyosis uteri. **Molecular**

human reproduction, England, v. 10, n. 12, p. 853–860, 2004.

OKADA, Hidetaka et al. Progesterins inhibit estradiol-induced vascular endothelial growth factor and stromal cell-derived factor 1 in human endometrial stromal cells. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 96, n. 3, p. 786–791, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028211010259>>

ORAZOV, M. R. et al. Proangiogenic features in chronic pelvic pain caused by adenomyosis. **Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology**, England, v. 32, n. sup2, p. 7–10, 2016.

PARKER, James S.; ROE, S. Mark; BARFORD, David. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. **The EMBO journal**, England, v. 23, n. 24, p. 4727–4737, 2004.

PIVER, P. Uterine factors limiting ART coverage. **Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction**, [s. l.], v. 34, n. 7 Pt 2, p. 5S30-5S33, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16340902>>

QIAO, Dan et al. Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. **Oncogene**, [s. l.], v. 21, n. 25, p. 3988–3999, 2002. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=12037681&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1038/sj.onc.1205505>>

REINHOLD, Caroline; TAFAZOLI, Faranak; WANG, Lin. Imaging features of adenomyosis. **Human Reproduction Update**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 337–349, 1998.

RÖMER, Thomas. Long-term treatment of endometriosis with dienogest: retrospective analysis of efficacy and safety in clinical practice. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, [s. l.], n. 0123456789, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00404-018-4864-8>>

SALIM, Rehan et al. Adenomyosis reduces pregnancy rates in infertile women undergoing IVF. **Reproductive biomedicine online**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 273–7, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22832421>>

SASAGAWA, Shinichi et al. Dienogest is a selective progesterone receptor agonist in transactivation analysis with potent oral endometrial activity due to its efficient pharmacokinetic profile. **Steroids**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 222–231, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039128X07002012>>

SASAKI, Takashi et al. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. **Genomics**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 323–30, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12906857>>

SIDDIQI, Sara; MATUSHANSKY, Igor. Piwis and piwi-interacting RNAs in the epigenetics of cancer. **Journal of cellular biochemistry**, United States, v. 113, n. 2, p. 373–380, 2012.

SOFIC, Amela et al. The Significance of MRI Evaluation of the Uterine Junctional Zone in the Early Diagnosis of Adenomyosis. [s. l.], v. 24, n. 2, p. 103–106, 2016.

SONG, Ji-Joon et al. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. **Nature structural biology**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1026–32, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625589>>

SONG, Ji-Joon et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 305, n. 5689, p. 1434–7, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15284453>>

STREULI, Isabelle et al. An update on the pharmacological management of adenomyosis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 15, n. 16, p. 2347–2360, 2014. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14656566.2014.953055>>

SUN, Guan et al. Clinical significance of Hiwi gene expression in gliomas. **Brain Research**, [s. l.], v. 1373, p. 183–188, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899310026107>>

TAN, Cheong-Huat et al. Zivi, the zebrafish homologue of the Drosophila piwi: co-localization with vasa at the embryonic genital ridge and gonad-specific expression in the adults. **Gene expression patterns : GEP**, Netherlands, v. 2, n. 3–4, p. 257–260, 2002.

TAYLOR, J. L. et al. Structural analysis and activation by fungal infection of a gene encoding a pathogenesis-related protein in potato. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 72–77, 1990.

THALLURI, V.; TREMELLEN, K. P. Ultrasound diagnosed adenomyosis has a negative impact on successful implantation following GnRH antagonist IVF treatment. **Human reproduction (Oxford, England)**, [s. l.], v. 27, n. 12, p. 3487–92, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22997247>>

THOMSON, Travis; LIN, Haifan. The Biogenesis and Function of PIWI Proteins and piRNAs: Progress and Prospect. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 355–376, 2009. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175327>>

TREMELLEN, Kelton P.; RUSSELL, Peter. The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure. II:

Adenomyosis and macrophages. **Journal of Reproductive Immunology**, [s. l.], v. 93, n. 1, p. 58–63, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2011.12.001>>

UDUWELA, A. S. et al. Endometrial-myometrial interface: relationship to adenomyosis and changes in pregnancy. **Obstetrical & gynecological survey**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 390–400, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10841317>>

VAGIN, V. V. et al. A Distinct Small RNA Pathway Silences Selfish Genetic Elements in the Germline. **Science**, [s. l.], v. 313, n. 5785, p. 320–324, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1129333>>

VAN WOLFSWINKEL, Josien C. Piwi and potency: PIWI proteins in animal stem cells and regeneration. **Integrative and comparative biology**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 700–713, 2014.

VANNUCCINI, Silvia et al. Pathogenesis of adenomyosis: an update on molecular mechanisms. **Reproductive BioMedicine Online**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 592–601, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.06.016>>

VANNUCCINI, Silvia et al. Role of medical therapy in the management of uterine adenomyosis. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 109, n. 3, 2018. Disponível em: <www.sciencedirect.com/science?_ob=GatewayURL&_origin=IRSSSEARCH&_method=citationSearch&_piikey=S001502821830013X&_version=1&md5=651ae636d7a2ecf909eb1fd7a528c1e2>

W., Liu et al. Hiwi facilitates chemoresistance as a cancer stem cell marker in cervical cancer. **Oncology Reports**, Y. Gao, Department of Pediatric Surgery, Second Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, China, v. 32, n. 5, p. 1853–1860, 2014. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L600071657>>

WANG, Xiuxing et al. MILI, a PIWI family protein, inhibits melanoma cell migration through methylation of LINE1. **Biochemical and biophysical research communications**, United States, v. 457, n. 4, p. 514–519, 2015.

WANG, Yanli et al. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. **Nature**, [s. l.], v. 456, n. 7224, p. 921–6, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19092929>>

WANG, Zifeng et al. The Role of PIWIL4, an Argonaute Family Protein, in Breast Cancer. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], p. jbc.M116.723239, 2016. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M116.723239>>

WILCZYNSKA, Anna et al. Two Piwi proteins, Xiwi and Xili, are expressed in the

Xenopus female germline. **RNA (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 337–45, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144913>>

Y., Yang et al. Piwil2 modulates the invasion and metastasis of prostate cancer by regulating the expression of matrix metalloproteinase-9 and epithelial-mesenchymal transitions. **Oncology Letters**, J. Wei, Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, China, v. 10, n. 3, p. 1735–1740, 2015. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L605303603>>

YAMANAKA, Akiyoshi et al. Progesterone and synthetic progestin, dienogest, induce apoptosis of human primary cultures of adenomyotic stromal cells. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, [s. l.], v. 179, p. 170–174, 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301211514003066>>

YAN, H. et al. piRNA-823 contributes to tumorigenesis by regulating de novo DNA methylation and angiogenesis in multiple myeloma. **Leukemia**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 196–206, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/leu.2014.135>>

YAN, Kelley S. et al. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. **Nature**, [s. l.], v. 426, n. 6965, p. 468–74, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14615802>>

ZHAO, Yi-Ming et al. HIWI is associated with prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after curative resection. **Cancer**, [s. l.], v. 118, n. 10, p. 2708–2717, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.26524>>

ZHOU, Shengtao et al. Proteomics identification of annexin A2 as a key mediator in the metastasis and proangiogenesis of endometrial cells in human adenomyosis. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. M112.017988, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22493182>>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo traz pela primeira vez a identificação das proteínas PIWI humanas em tecido proveniente de mulheres que realizaram histerectomia com diagnóstico positivo de adenomiose. Através deste estudo, foi possível determinar a presença das proteínas PIWIL1, PIWIL2 e PIWIL4 na adenomiose. Para tal, a identificação e comparação de cada uma das proteínas estudadas no endométrio sadio (grupo controle) e no tecido adenomiótico e endométrio eutópico (grupo adenomiose) foi realizada. A proteína PIWIL1 se encontra reduzida no grupo adenomiose, a proteína PIWIL2 está com a expressão aumentada no grupo adenomiose e a proteína PIWIL4 não apresentou diferença significativa na expressão.

A partir deste trabalho, foi possível compreender que o padrão de expressão das três proteínas PIWI estudadas podem estar relacionadas com a fisiopatologia da adenomiose. Uma vez que este é o primeiro relato destas proteínas relacionando-as com a adenomiose, mais estudos que tenham como objetivo aprofundar o entendimento e compreensão da atividade proteica nesta patologia serão necessários.

PERSPECTIVAS

As perspectivas para essa linha de pesquisa envolvem a investigação do padrão de expressão proteica de acordo com a fase do ciclo menstrual das participantes, investigação se o processo de fixação das amostras degrada o material ao analisar amostras com menos de cinco anos decorridos do procedimento e investigação do padrão de expressão das proteínas PIWI em um estudo prospectivo. Tendo em vista que esta foi a primeira vez que as proteínas PIWI foram descritas em mulheres com adenomiose, as perspectivas também envolvem um estudo com mulheres inférteis, uma vez que já existem trabalhos na literatura que relacionam a adenomiose com desfechos desfavoráveis a gestação.

ANEXOS

ANEXO A - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO HCPA

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: RELAÇÃO ENTRE A ADENOMIOSE E AS PROTEÍNAS PIWI

Pesquisador: joao sabino lahorgue da cunha filho

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 63591516.0.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.198.674

Apresentação do Projeto:

Emenda submetida em 23/07/2017 solicita alterações no projeto.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da presente emenda é realizar alterações no projeto. São solicitadas alterações na metodologia e no tamanho amostral do projeto, além da adição de apêndices.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A presente emenda não altera a avaliação de riscos e benefícios anteriormente realizada para este projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Alterações listadas:

- Página 22 – delineamento do estudo: foi acrescentada a utilização de mais um grupo de estudo, portanto, o projeto será composto por dois grupos de estudo, o primeiro irá avaliar a presença de

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br



Continuação do Parecer: 2.198.674

proteínas PIWI no endométrio saudável das pacientes com diagnóstico positivo para adenomiose, o segundo grupo de estudo permanece sendo a avaliação da presença de proteínas PIWI na invasão endometrial ao miométrio e o grupo controle permanece sendo a avaliação da presença de proteínas PIWI em pacientes que realizaram histerectomia e tem o diagnóstico negativo para adenomiose.

O acréscimo de mais um grupo de estudo surgiu em decorrência da minimização de um possível viés de aferição, uma vez que estavam sendo comparados endométrios de pacientes diferentes. Dessa maneira, a avaliação do endométrio da paciente com diagnóstico positivo para adenomiose nos dois grupos de estudo irá permitir identificar se há diferença de expressão da proteína quando se comparam tecidos diferentes de uma mesma paciente. Ainda assim, a utilização do grupo controle com diagnóstico negativo para adenomiose também se faz importante para o projeto, tendo em vista que o endométrio saudável de pacientes com adenomiose pode apresentar expressões proteicas diferentes do que das pacientes que tem diagnóstico negativo de adenomiose.

• Página 22 – Extração de RNA: foi acrescentado ao projeto, o local de realização dos procedimentos moleculares, na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA.

Tendo em vista que a descrição dos locais de realização dos experimentos é de suma importância para a rastreabilidade do material biológico que será utilizado nesse estudo, o local onde serão realizados os experimentos de ordem molecular foi identificado no projeto.

• Página 23 – Imuno-histoquímica: foi acrescentado ao projeto, o local de realização das análises relacionadas a patologia, na Unidade de Patologia Experimental do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA.

Tendo em vista que a descrição dos locais de realização dos experimentos é de suma importância para a rastreabilidade do material biológico que será utilizado nesse estudo, o local onde serão realizados os experimentos de identificação proteica através da técnica de imuno-histoquímica foi identificada no projeto.

• Página 24 – Análise estatística: Em decorrência do acréscimo de um segundo grupo de estudo no projeto, foi necessário fazer uma alteração no item "análise estatística".

Para a análise de três grupos ou mais, faz-se uso dos testes ANOVA e Kruskal-Wallis quando a distribuição dos dados for paramétrica e não paramétrica, respectivamente (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Os testes estatísticos serão utilizados quando convier realizar a comparação entre os três grupos de estudo.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.198.674

• Página 25 – Cálculo do tamanho de amostra: Tendo em vista a utilização de uma metodologia computadorizada para fazer a análise da presença de proteínas PIWI nas lâminas de imuno-histoquímica, o n foi recalculado.

Para a utilização da metodologia do D-HSCORE para quantificar a presença de proteínas PIWI nos tecidos, assim como a proporção que se espera encontrar de proteínas em pacientes com e sem adenomiose, o tamanho de amostra teve um acréscimo de 5 peças anatômicas nos grupos em estudo e 5 peças anatômicas no grupo controle, um total de 72 peças serão analisadas (36 por grupo – pacientes com adenomiose terão o endométrio saudável e o alterado avaliados, portanto será a mesma peça).

• Página 28 – Apêndice A: Foi acrescido ao projeto de pesquisa, a ficha com dados para a caracterização da amostra que será estudada, tendo em vista que essas características serão importantes para a compreensão da fisiopatologia da adenomiose e é de grande valia já constar no projeto.

• Página 30 – Apêndice C: Foi adicionado ao projeto, o Formulário de Autorização das Áreas de Apoio para Projeto de Pesquisa e de Desenvolvimento afim de que os respectivos locais de origem e apoio do projeto estejam devidamente cientes de sua participação neste estudo. Aquelas áreas de apoio que forem pertinentes também serão adicionadas no WebGPPG.

Referências

CALLEGARI-JACQUES, S. M. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed, 2003.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram adicionados os seguintes documentos:

- ProjetoMsc.docx
- CartaDeJustificativa.docx

Recomendações:

* A emenda inclui mais um grupo, totalizando na verdade 3 diferentes grupos de amostras a serem analisados. De acordo com as informações do projeto, parece que serão analisadas 108 amostras oriundas de 72 peças. Se for o caso, verificar se o cálculo de tamanho da amostra está adequado a esta informação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda não apresenta pendências e está em condições de aprovação.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
 Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.198.674

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda submetida em 23/07/2017 aprovada, modifica metodologia e tamanho amostral.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_966580 E1.pdf	23/07/2017 21:01:07		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoMsc.docx	23/07/2017 20:59:31	joao sabino lahorgue da cunha filho	Aceito
Outros	CartaDeJustificativa.docx	23/07/2017 20:57:28	joao sabino lahorgue da cunha filho	Aceito
Outros	pendenciaMSC.docx	28/02/2017 13:18:27	joao sabino lahorgue da cunha filho	Aceito
Outros	DelegacaodeFuncoes.pdf	11/12/2016 18:44:31	joao sabino lahorgue da cunha filho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	MaterialBiologico.pdf	11/12/2016 18:44:04	joao sabino lahorgue da cunha filho	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoPIWI.pdf	11/12/2016 18:43:48	joao sabino lahorgue da cunha filho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:





Não

PORTO ALEGRE, 02 de Agosto de 2017

Assinado por:
Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador)

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
 Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.edu.br

ANEXO B - APROVAÇÃO NA PLATAFORMA BRASIL

Público **Pesquisador** **Alterar Meus Dados** joão sabino lahorgue da cunha filho - Pesquisador | V3.0

Cadastros Sua sessão expira em: 39min 45

GERIR PESQUISA

Para cadastrar um novo projeto, clique aqui: [Nova Submissão](#) Para cadastrar projetos aprovados anteriores à Plataforma Brasil, clique aqui: [Projeto anterior](#)

BUSCAR PROJETO DE PESQUISA:

Título do Projeto de Pesquisa: CAAE:

Pesquisador Responsável: Última Modificação: Tipo de Projeto:

Palavra-chave:


SITUAÇÃO DA PESQUISA

Marcar Todas
 Aprovado
 Em Apreciação Ética
 Em Edição
 Em Recepção e Validação Documental
 Não Aprovado - Não Cabe Recurso
 Não Aprovado na CONEP

Não Aprovado no CEP
 Pendência Documental Emitida pela CONEP
 Pendência Emitida pela CONEP
 Pendência Emitida pelo CEP

Recurso Submetido ao CEP
 Recurso Submetido à CONEP
 Recurso não Aprovado no CEP
 Retirado
 Retirado pelo Centro Coordenador

LISTA DE PROJETOS DE PESQUISA:

Tipo ¹	CAAE ²	Versão ³	Pesquisador Responsável ⁴	Comitê de Ética ⁵	Instituição ⁶	Origem ⁷	Última Apreciação ⁸	Situação ⁹	Ação
P	63591516.0.0000.5327	2	joão sabino lahorgue da cunha filho	5327 - UFRGS - Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre	PO	PO	Aprovado	

LEGENDA:


(¹) Tipo
 P = Projeto de Centro Coordenador Pp = Projeto de Centro Participante Pc = Projeto de Centro Coparticipante


(²) Formação do CAAE


n	n	n	n	n	n	a	a	.	d	v	.	t	x	x	x	.	i	i	i	i
Ano de submissão do Projeto						Tipo do centro		Código do Comitê que está analisando o projeto												
Sequencial para todos os Projetos submetidos para apreciação						Dígito verificador		Sequencial quando estudo possui Centro(s) Participante(s) e/ou Coparticipante(s)												

(⁷) Origem / Última Apreciação

PO = Projeto Original de Centro Coordenador	POp = Projeto Original de Centro Participante	POc = Projeto Original de Centro Coparticipante
E = Emenda de Centro Coordenador	Ep = Emenda de Centro Participante	Ec = Emenda de Centro Coparticipante
N = Notificação de Centro Coordenador	Np = Notificação de Centro Participante	

(⁹) Lista de Projetos de Pesquisa
 - A exibição da ação  indica que existem uma ou mais emendas em fila, ou seja, que aguardam apreciação.


 Este sistema foi desenvolvido para os navegadores Internet Explorer (versão 7 ou superior) ou Mozilla Firefox (versão 9 ou superior).


 GOVERNO FEDERAL
 SAÚDE
 PLATAFORMA BRASIL

ANEXO D - STROBE Statement - Checklist of items that should be included in reports of *cross-sectional studies*

	Item No	Recommendation
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found
Introduction		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses
Methods		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias
Study size	10	Explain how the study size was arrived at
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions (c) Explain how missing data were addressed (d) If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy (e) Describe any sensitivity analyses
Results		
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed (b) Give reasons for non-participation at each stage (c) Consider use of a flow diagram
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses

Discussion		
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results
Other information		
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based

*Give information separately for exposed and unexposed groups.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.

ANEXO E – Informações essenciais do anticorpo anti-PIWIL1


[Product datasheet](#)

Anti-PIWIL1 antibody ab12337

★★★★★ 4 Abreviews 18 References 3 Images

Overview

Product name	Anti-PIWIL1 antibody
Description	Rabbit polyclonal to PWIL1
Host species	Rabbit
Tested applications	Suitable for: WB, IHC-P, ICC/IF, IP
Species reactivity	Reacts with: Mouse, Rat, Human
Immunogen	Synthetic peptide derived from within residues 800 - 900 of Human PWIL1. Read Abcam's proprietary immunogen policy (Peptide available as ab13827 .)
Positive control	Miwi is exclusively expressed in spermatocytes and hematopoietic stem cells. WB: Mouse and rat testis tissue lysates. ICC/IF: methanol fixed HeLa cells.

Properties

Form	Liquid
Storage instructions	Shipped at 4°C. Store at +4°C short term (1-2 weeks). Upon delivery aliquot. Store at -20°C or -80°C. Avoid freeze / thaw cycle.
Storage buffer	Preservative: 0.02% Sodium Azide Constituents: 1% BSA, PBS, pH 7.4
Purity	Immunogen affinity purified
Clonality	Polyclonal
Isotype	IgG

Applications

Our [Abpromise guarantee](#) covers the use of **ab12337** in the following tested applications.

The application notes include recommended starting dilutions; optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.

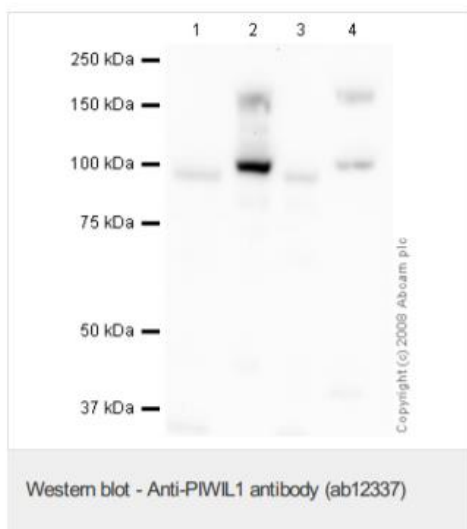
Application	Abreviews	Notes
-------------	-----------	-------

Application	Abreviews	Notes
WB	★★★★★	Use a concentration of 1 µg/ml. Detects a band of approximately 99 kDa (predicted molecular weight: 99 kDa). Can be blocked with Human PWM1 peptide (ab13827) . ab12337 detects a 99 kDa band in both mouse and rat testis lysates (positive controls). Non-specific bands at 102 kDa were also observed in mouse and rat liver lysates (negative controls).
IHC-P		Use at an assay dependent concentration. Perform heat mediated antigen retrieval with citrate buffer pH 6 before commencing with IHC staining protocol.
ICC/IF		Use a concentration of 10 µg/ml.
IP		Use at an assay dependent concentration. PubMed: 19918066

Target

Function	Plays a central role during spermatogenesis by repressing transposable elements and prevent their mobilization, which is essential for the germline integrity. Acts via the piRNA metabolic process, which mediates the repression of transposable elements during meiosis by forming complexes composed of piRNAs and Piwi proteins and govern the methylation and subsequent repression of transposons. Directly binds methylated piRNAs, a class of 24 to 30 nucleotide RNAs that are generated by a Dicer-independent mechanism and are primarily derived from transposons and other repeated sequence elements. Besides their function in transposable elements repression, piRNAs are probably involved in other processes during meiosis such as translation regulation. Probable component of some RISC complex, which mediates RNA cleavage and translational silencing. Also plays a role in the formation of chromatoid bodies and is required for some miRNAs stability (By similarity). Isoform 3 may be a negative developmental regulator.
Tissue specificity	Detected in most fetal and adult tissues. Expressed in testes, specifically in germline cells; detected in spermatocytes and spermatids during spermatogenesis. Increased expression in testicular tumors originating from embryonic germ cells with retention of germ cells phenotype. No expression in testicular tumors of somatic origin, such as Sertoli cell and Leydig cell tumors. Overexpressed in gastric cancer cells. Isoform 3 is ubiquitously expressed, and specifically in CD34+ hematopoietic progenitor cells but not in more differentiated cells.
Sequence similarities	Belongs to the argonaute family. Piwi subfamily. Contains 1 PAZ domain. Contains 1 Piwi domain.
Domain	The PAZ domain specifically recognizes binds the 2'-O-methylated 3'-end of piRNAs.
Post-translational modifications	Arginine methylation by PRMT5 is required for the interaction with Tudor domain-containing protein (TDRD1, TDRKH/TDRD2, RNF17/TDRD4, TDRD6, TDRD7 and TDRD9) and subsequent localization to the meiotic nuage, also named P granule.
Cellular localization	Cytoplasm. Component of the meiotic nuage, also named P granule, a germ-cell-specific organelle required to repress transposon during meiosis. Also present in chromatoid body.

Images



All lanes : Anti-PIWIL1 antibody (ab12337) at 1 µg/ml

Lane 1 : Testis (Mouse) Tissue Lysate

Lane 2 : Liver (Mouse) Tissue Lysate

Lane 3 : Testis (Rat) Tissue Lysate - normal tissue ([ab29388](#))

Lane 4 : Liver (Rat) Tissue Lysate

Lysates/proteins at 10 µg per lane.

Secondary

All lanes : Goat polyclonal to Rabbit IgG - H&L - Pre-Adsorbed (HRP) at 1/3000 dilution

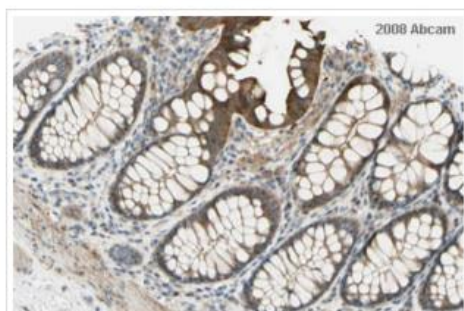
Performed under reducing conditions.

Predicted band size: 99 kDa

Observed band size: 99 kDa

Additional bands at: 102 kDa (possible non-specific binding)

ab12337 gave a positive signal in both mouse and rat testis lysates (positive controls). Bands were also observed in mouse and rat liver lysates (negative controls) that were higher in size to that observed in testis.

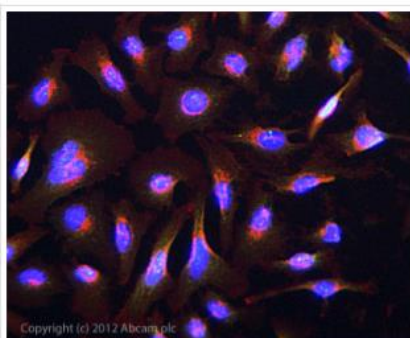


Immunohistochemistry (Formalin/PFA-fixed paraffin-embedded sections) - Anti-PIWIL1 antibody (ab12337)

Image courtesy of [Human Protein Atlas](#)

ab12337 staining PWI Human female colon, showing a distinct and strong staining pattern at glandular cells. Paraffin embedded human colon tissue was incubated with ab12337 (1/200 dilution) for 30 mins at room temperature. Antigen retrieval was performed by heat induction in citrate buffer pH 6.

ab12337 was tested in a tissue microarray (TMA) containing a wide range of normal and cancer tissues as well as a cell microarray consisting of a range of commonly used, well characterised human cell lines. Further results for this antibody can be found at www.proteinatlas.org



Immunocytochemistry/ Immunofluorescence - Anti-PIWIL1 antibody (ab12337)

ICC/IF image of ab12337 stained HeLa cells. The cells were 100% methanol fixed (5 min) and then incubated in 1%BSA / 10% normal goat serum / 0.3M glycine in 0.1% PBS-Tween for 1h to permeabilise the cells and block non-specific protein-protein interactions. The cells were then incubated with the antibody ab12337 at 1µg/ml overnight at +4°C. The secondary antibody (green) was DyLight® 488 goat anti- rabbit (ab96899) IgG (H+L) used at a 1/250 dilution for 1h. Alexa Fluor® 594 WGA was used to label plasma membranes (red) at a 1/200 dilution for 1h. DAPI was used to stain the cell nuclei (blue) at a concentration of 1.43µM.

Please note: All products are "FOR RESEARCH USE ONLY AND ARE NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE"

Our Abpromise to you: Quality guaranteed and expert technical support

- Replacement or refund for products not performing as stated on the datasheet
- Valid for 12 months from date of delivery
- Response to your inquiry within 24 hours
- We provide support in Chinese, English, French, German, Japanese and Spanish
- Extensive multi-media technical resources to help you
- We investigate all quality concerns to ensure our products perform to the highest standards

If the product does not perform as described on this datasheet, we will offer a refund or replacement. For full details of the Abpromise, please visit <https://www.abcam.com/abpromise> or contact our technical team.

Terms and conditions

- Guarantee only valid for products bought direct from Abcam or one of our authorized distributors

ANEXO F - Informações essenciais do anticorpo anti-PIWIL2

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Lot Number: SA2321283

Website: thermofisher.com
Customer Service(US): 1 800 955 6288 ext. 1
Technical Support (US): 1 800 955 6288 ext. 441
thermofisher.com/contactus



PIWIL2 Polyclonal Antibody

Catalog Number: PA5-34341

Product Data Sheet

Details		Species Reactivity	
Size	100 ug	Tested species reactivity	Human
Host / Isotype	Rabbit / IgG	Tested Applications	Dilution *
Class	Polyclonal	Immunohistochemistry (IHC)	5 ug/mL
Type	Antibody	* Suggested working dilutions are given as a guide only. It is recommended that the user titrate the product for use in their own experiment using appropriate negative and positive controls.	
Immunogen	A 14 amino acid synthetic peptide near the center of human PIWI-L2		
Form	Liquid		
Concentration	1mg/ml		
Purification	Antigen affinity chromatography		
Storage Buffer	PBS		
Contains	0.02% sodium azide		
Storage Conditions	Maintain refrigerated at 2-8°C for up to 3 months. For long term storage store at -20°C		

Product Specific Information

A suggested positive control is human brain tissue lysate.

PA5-34341 can be used with blocking peptide PEP-1384.

Background/Target Information

PIWI-L2 is a member of the PIWI subfamily of Argonaute proteins, evolutionarily conserved proteins containing both PAZ and Piwi motifs that are crucial for the biogenesis and function of small non-coding RNAs and play important roles in stem cell self-renewal, RNA silencing, and translational regulation in diverse organisms. PIWI-L2 has been implicated in multiple roles including stem cell self-renewal and is highly expressed in many breast cancers. In these tumors, PIWI-L2 silences the expression of STAT3, a regulator of Bcl-XL and cyclin D1, allowing the proliferation and survival of breast cancer stem cells. Recent studies have shown that overexpression of PIWI-like proteins are potential biomarkers for colon and other cancers.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Not for resale without express authorization.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Not for resale without express authorization.

Products are warranted to operate or perform substantially in conformance with published Product specifications in effect at the time of sale, as set forth in the Production documentation, specifications and/or accompanying package inserts ("Documentation"). No claim of suitability for use in applications regulated by FDA is made. The warranty provided herein is valid only when used by properly trained individuals. Unless otherwise stated in the Documentation, this warranty is limited to one year from date of shipment when the Product is subjected to normal, proper and intended usage. This warranty does not extend to anyone other than the Buyer. Any model or sample furnished to Buyer is merely illustrative of the general type and quality of goods and does not represent that any Product will conform to such model or sample.

NO OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, ARE GRANTED INCLUDING WITHOUT LIMITATION, IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR ANY PARTICULAR PURPOSE, OR NON-INFRINGEMENT. BUYER'S EXCLUSIVE REMEDY FOR NON-CONFORMING PRODUCTS DURING THE WARRANTY PERIOD IS LIMITED TO REPAIR, REPLACEMENT OF OR REFUND FOR THE NON-CONFORMING PRODUCT(S) AT SELLER'S SOLE OPTION. THERE IS NO OBLIGATION TO REPAIR, REPLACE OR REFUND FOR PRODUCTS AS THE RESULT OF: (I) ACCIDENT, DISASTER OR EVENT OF FORCE MAJEURE, (II) MISUSE, FAULT OR NEGLIGENCE OF OR BY BUYER, (III) USE OF THE PRODUCTS IN A MANNER FOR WHICH THEY WERE NOT DESIGNED OR (IV) IMPROPER STORAGE AND HANDLING OF THE PRODUCTS. Unless otherwise expressly stated on the Product or in the documentation accompanying the Product, the Product is intended for research only and is not to be used for any other purpose, including without limitation, unauthorized commercial uses, in vitro diagnostic uses, ex vivo or in vivo therapeutic uses, or any type of consumption by or application to human or animals.

Thermo Fisher Scientific
3747 N. Meridian Road
Rockford, IL 61105 USA

ANEXO G – Informações essenciais do anticorpo anti-PIWIL4

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Lot Number: SE2395112E

Website: thermofisher.com
Customer Service (US): 1 800 955 6288 ext. 1
Technical Support (US): 1 800 955 6288 ext. 441
thermofisher.com/contactus

Performance
guaranteed 

PIWIL4 Polyclonal Antibody

Catalog Number PA5-31448

Product Data Sheet

Details		Species Reactivity	
Size	100µL	Tested species reactivity	Human
Host / Isotype	Rabbit / IgG	Tested Applications	Dilution *
Class	Polyclonal	Immunocytochemistry (ICC)	1:100-1:1000
Type	Antibody	Immunofluorescence (IF)	1:100-1:1000
Immunogen	Recombinant fragment corresponding to a region within amino acids 639 and 852 of Human PIWIL4	Immunohistochemistry (Paraffin) (IHC (P))	1:100-1:1000
Conjugate	Unconjugated	Western Blot (WB)	1:500-1:3000
Form	Liquid	* Suggested working dilutions are given as a guide only. It is recommended that the user titrate the product for use in their own experiment using appropriate negative and positive controls.	
Concentration	1mg/ml		
Purification	Antigen affinity chromatography		
Storage Buffer	PBS, pH 7, with 1% BSA, 20% glycerol		
Contains	0.01% thimerosal		
Storage Conditions	-20° C, Avoid Freeze/Thaw Cycles		

Product Specific Information

PA5-31448 targets PIWIL4 in IF, IHC (P), and WB applications and shows reactivity with Human samples.

The PA5-31448 immunogen is recombinant fragment corresponding to a region within amino acids 639 and 852 of Human PIWIL4.

Background/Target Information

PIWIL4 belongs to the Argonaute family of proteins, which function in development and maintenance of germline stem cells (Sasaki et al., 2003 [PubMed 12906857]).

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Not for resale without express authorization.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Not for resale without express authorization.

Products are warranted to operate or perform substantially in conformance with published Product specifications in effect at the time of sale, as set forth in the Product documentation, specifications and/or accompanying package inserts ("Documentation"). No claim of suitability for use in applications regulated by FDA is made. The warranty provided herein is valid only when used by properly trained individuals. Unless otherwise stated in the Documentation, this warranty is limited to one year from date of shipment when the Product is subjected to normal, proper and intended usage. This warranty does not extend to anyone other than the Buyer. Any model or sample furnished to Buyer is merely illustrative of the general type and quality of goods and does not represent that any Product will conform to such model or sample.

NO OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, ARE GRANTED INCLUDING WITHOUT LIMITATION, IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR ANY PARTICULAR PURPOSE, OR NON-INFRINGEMENT. BUYER'S EXCLUSIVE REMEDY FOR NON-CONFORMING PRODUCTS DURING THE WARRANTY PERIOD IS LIMITED TO REPAIR, REPLACEMENT OF OR REFUND FOR THE NON-CONFORMING PRODUCT(S) AT SELLER'S SOLE OPTION. THERE IS NO OBLIGATION TO REPAIR, REPLACE OR REFUND FOR PRODUCTS AS THE RESULT OF (i) ACCIDENT, DISASTER OR EVENT OF FORCE MAJEURE, (ii) MISUSE, FAULT OR NEGLIGENCE OF OR BY BUYER, (iii) USE OF THE PRODUCTS IN A MANNER FOR WHICH THEY WERE NOT DESIGNED, OR (iv) IMPROPER STORAGE AND HANDLING OF THE PRODUCTS. Unless otherwise expressly stated on the Product or in the documentation accompanying the Product, the Product is intended for research only and is not to be used for any other purpose, including without limitation, unauthorized commercial uses, in vitro diagnostic uses, in vivo or in vivo therapeutic uses, or any type of consumption by or application to human or animals.

Thermo Fisher Scientific
3747 N. Meridian Road
Rockford, IL 61105 USA