



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MESTRADO

MARCELLA GARCEZ DUARTE

**INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE FÍSICA NAS CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS E RESPOSTA IMUNE EM MODELO ANIMAL DE
ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL**

CURITIBA
2017

**INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE FÍSICA NAS CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS E RESPOSTA IMUNE EM MODELO ANIMAL DE
ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita Souza

Co-orientadora Prof.^a Dr.^a Vivian Ferreira do Amaral

CURITIBA
2017

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

Duarte, Marcella Garcez
D812i Influência da atividade física nas citocinas inflamatórias e resposta imune
2017 em modelo animal de endometriose experimental / Marcella Garcez Duarte ;
orientador: Luiz Cesar Guarita Souza ; coorientador: Vivian Ferreira do Amaral.
– 2017.
83 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2017
Bibliografia: f. 74-80

1. Ciências da Saúde. 2. Endometriose. 3. Citocinas. 4. Exercícios físicos.
5. Resposta imune - Regulamento. I. Souza, Luiz Cesar Guarita. I. Amaral,
Vivian Ferreira do II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20 ed. – 610



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos cinco dias do mês de dezembro de 2017 às 13hs e 00min., realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação “**Influência da atividade física nas citocinas inflamatórias e resposta imune em modelo animal de endometriose experimental**” apresentado por **Marcella Garcez Duarte** para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita de Souza – Presidente (PUCPR)	
Prof. Dr. Julio Cesar Francisco – (UP)	
Prof. Dr. Thyago Proença de mORAES (PUCPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita de Souza

Conceito: APROVADA

Prof. Dr. Julio Cesar Francisco

Conceito: APROVADA

Prof. Dr. Thyago Proença de Moraes

Conceito: Aprovada

Parecer Final: APROVADA

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita de Souza
Presidente da Banca Examinadora

Prof.ª Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Escola de Medicina - PUCPR
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

DEDICATÓRIA

Dedico esta grande conquista à minha família que me incentiva e apoia em todos os momentos. Meu esposo Oscar, alicerce e companheiro de caminhada, meus filhos João Antônio e Maria Amélia, principais motivos da minha existência e minha mãe Joseli, minha raiz e referência. Meu amor mais profundo a vocês.

AGRADECIENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita Souza por ter, sem objeções, se disponibilizado a ser meu orientador na fase final do estudo, pela oportunidade e honra de concluir com brilhante orientação.

À minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Vivian Ferreira do Amaral, pela confiança em mim depositada, pelos seus ensinamentos, pelas suas orientações, pelo seu tempo dedicado à elaboração, execução, apresentação e publicação deste trabalho, mesmo quando não mais teria obrigatoriedade formal. Seus conhecimentos, seu comprometimento, sua generosidade e sua amizade foram condicionais para a viabilidade deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita que foi orientador durante todo o período de análise laboratorial, pelos direcionamentos e auxílio na execução deste projeto.

À colega de profissão, Caroline Peschel Alves Brustolin Iplinski, que durante o Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica nesta universidade, foi responsável pela fase inicial deste projeto de pesquisa, a qual executou com maestria, responsabilidade e excelência.

Ao Prof. Dr. Ricardo Correa Cunha, pela importante colaboração e direcionamentos referentes a área de fisiologia do exercício que compõe o estudo.

Ao Prof. Dr. Julio Cesar Francisco, pela conduta ética, pelo auxílio e pelas orientações durante toda a fase experimental deste projeto.

À colega de mestrado Elaine Doff Sotta, pela inestimável colaboração durante o processo de análise laboratorial deste estudo.

À Prof.^a Marcia Olandowski, pelos ensinamentos em bioestatística e pela colaboração nas análises estatísticas, condicionais para as conclusões obtidas.

À Jane Fábica Domênica, secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, por sua toda sua atenção, disponibilidade e profissionalismo.

À esta Universidade e aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, que direta ou indiretamente, em todas as fases, com aulas, seminários, orientações e avaliações, colaboraram com este projeto de pesquisa.

EPÍGRAFE

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

George Bernard Shaw

RESUMO

A endometriose é uma doença crônica, de alta prevalência, que até o momento não conta com protocolos de tratamento específicos nem cura definitiva. Considerando que a prática de atividade física tem efeito benéfico e faz parte do arsenal terapêutico de doenças crônicas inflamatórias, procuramos observar as eventuais influências da prática de atividade física em ratas submetidas à endometriose experimental. OBJETIVO: Analisar a influência dos modos de exercícios físicos nos níveis séricos de citocinas inflamatórias de ratas com endometriose experimental, para avaliar se a prática pode auxiliar no tratamento da doença. MÉTODOS: O estudo experimental foi realizado com 40 ratas, distribuídas aleatoriamente em 4 grupos de 10 animais. Três grupos que praticaram atividade física, anaeróbica (G1), aeróbica (G2), aeróbica e anaeróbica combinadas (G3) e um grupo controle com ratas sedentárias (G4) por 3 semanas. O tamanho dos implantes de endometriose, as interleucinas IL-2, IL-4 e o TNF- α sérico foram medidos antes e após a prática da atividade física. RESULTADOS: Para todos os grupos foi realizada a classificação histológica de Keenan, no início da atividade física e na eutanásia. No G1 que aparentemente não havia apresentado diferenças significativas na análise macroscópica, as medidas das citocinas IL-2, IL-4 e TNF- α apresentaram alterações expressivas. O G2 que fez atividade aeróbica e apresentou redução significativa no tamanho médio dos implantes, teve aumento da IL-4. No G3, que praticou e somou os tempos das duas modalidades, não houve importante diferença nas citocinas. O G4, controle, apresentou discreto aumento no tamanho médio dos implantes e não teve diferenças significativas nas citocinas. CONCLUSÃO: Os resultados sugerem que a prática moderada de atividade física parece ser benéfica na endometriose, enquanto que o treino excessivo pode causar alterações na liberação de citocinas e na resposta imune, que agravam a doença como o sedentarismo.

PALAVRAS-CHAVE: Endometriose; Inflamação; Citocinas; Atividade física; Resposta imune.

ABSTRACT

Endometriosis is a chronic disease, of high prevalence, that until now has no specific treatment protocols or definitive cure. Considering that the practice of physical activity has a beneficial effect and is part of the therapeutic arsenal of chronic inflammatory diseases, we try to observe the possible influences of the practice of physical activity in rats submitted to experimental endometriosis. **OBJECTIVE:** To analyze the influence of physical exercise modes on the serum levels of inflammatory cytokines of rats with experimental endometriosis, in order to evaluate if the practice can help in the treatment of the disease. **METHODS:** The experimental study was performed with 40 rats, randomly assigned to 4 groups of 10 animals. Three groups that practiced physical, anaerobic (G1), aerobic (G2), aerobic and anaerobic combined (G3) and a control group with sedentary rats (G4) for 3 weeks. The size of the endometriosis implants, interleukins IL-2, IL-4 and serum TNF- α were measured before and after physical activity. **RESULTS:** Histological classification of Keenan was performed for all groups at the beginning of physical activity and in euthanasia. In the G1 that apparently did not present significant differences in the macroscopic analysis, the measurements of IL-2, IL-4 and TNF- α cytokines presented significant alterations. The G2, which performed aerobic activity and presented a significant reduction in the mean size of the implants, had an increase in IL-4. In G3, which practiced and summed the times of the two modalities, there was no significant difference in the cytokines. The G4, control, showed a slight increase in the mean size of the implants and did not have significant differences in the cytokines. **CONCLUSION:** The results suggest that the moderate practice of physical activity seems to be beneficial in endometriosis, whereas excessive training may cause changes in the release of cytokines and immune response, which aggravate the disease as a sedentary lifestyle.

KEYWORDS: Endometriosis; Inflammation; Cytokines; Physical activity; Immune response.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMP – Adenosina monofosfato
AMPk – Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
ATP – Adenosina Adenosina trifosfato
CD – Contagem de linfócitos
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
E – Eutanásia
G – Grupo
GM-CSF – Fator de estímulo de colônias de granulócitos macrófagos
I – Inicial
IL – Interleucina
IL-1ra – Antagonista do receptor de interleucina-1
IFN- γ – Interferon gama
LPL – Lipase lipoproteica
MHC – Moléculas de histocompatibilidade
N – Número de modelos experimentais
NIMA – Núcleo Interdisciplinar de Meio Ambiente
NK – Células natural killer
PCR – Proteína C reativa
PUC-PR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná
R – Reabertura
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
SAA – Proteína amilóide sérica A
SHBG – Globulina de ligação de hormônios sexuais
Th – Linfócito T helper ou auxiliador
Th1/Th2 – Resposta imune tipo Th1/Th2
TNF – Fator de necrose tumoral
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
VO₂ – Volume de Oxigênio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resposta imune Th1/Th2	19
Figura 2. Indução da endometriose: Após incisão longitudinal na linha Alba, identificação do corno uterino esquerdo.....	33
Figura 3. Cirurgia de reabertura e medida dos implantes peritoneais (A/B).	34
Figura 4. Coletes de peso para a prática de atividade física anaeróbica	36
Figura 5. Atividade anaeróbica: Rata do Grupo 1 em dois momentos: em A, indo ao fundo da piscina e em B, realizando um salto.....	37
Figura 6. Atividade aeróbia: Grupo 1 realizando 60 min de atividade física na esteira ergométrica (A / B)	37
Figura 7. Kit Luminex ® Novex da Life Thecnologie.....	39
Figura 8. Bula Kit Luminex ®.....	40
Figura 9. Equipamentos Laboratório NIMA PUC-PR.....	41
Figura 10. Separação das amostras.....	41
Figura 11. Preparação da placa.....	42
Figura 12. Leitura da placa.....	42
Figura 13. Crescimento dos implantes peritoneais 21 dias após indução cirúrgica.....	45
Figura 14. Avaliações dos pesos e as diferenças entre as avaliações. Estatísticas descritivas de acordo com os grupos e os valores de p.....	47
Figura 15. Áreas dos implantes em cada grupo na reabertura e na eutanásia.....	49
Figura 16. Percentuais de Keenan por grupo na eutanásia.....	51
Figura 17. Mediana do TNF- α por grupo, na reabertura e na eutanásia.....	53
Figura 18. Mediana da IL-2 por grupo, na reabertura e na eutanásia.....	56
Figura 19. Mediana da IL-4 por grupo, na reabertura e na eutanásia.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Correlação dias/anos da idade dos ratos em relação a dos humanos.....	35
Tabela 2. Grupos do experimento e seu N final.....	38
Tabela 3. Área dos implantes das ratas após 21 dias da cirurgia.....	45
Tabela 4. Avaliações de peso e diferenças de pesos entre as fases de avaliação.....	46
Tabela 5. Áreas dos implantes (cm ²) de cada grupo, nos momentos de avaliação.....	48
Tabela 6. Análise do índice Keenan entre os grupos	50
Tabela 7. Avaliações de TNF- α e as diferenças entre as avaliações por grupo.....	52
Tabela 8. Valores de p para as comparações do TNF- α	53
Tabela 9. Avaliações de IL-2 e as diferenças entre as avaliações por grupo	54
Tabela 10. Comparações entre os valores de p dos grupos para a IL-2.....	55
Tabela 11. Valores de p para as comparações da IL-2.....	55
Tabela 12. Avaliações de IL-4 e diferenças entre as avaliações por grupo...	57
Tabela 13. Comparações entre os valores de p dos grupos para a IL-4.....	58
Tabela 14. Valores de p para as comparações da IL-4.....	58

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Núcleo de Bioética do CEUA PUCPR	82
Anexo 2. Pôster apresentado durante o 13th World Congress on Endometriosis em Vancouver-CA, de 17 a 20 de maio de 2017	83
Anexo 3. Artigo.....	84

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
3. JUSTIFICATIVA	27
4. OBJETIVO	29
5. MATERIAIS E MÉTODOS	31
6. RESULTADOS	44
7. DISCUSSÃO	60
8. CONCLUSÃO	69
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	71
10. REFERÊNCIAS	73
11. ANEXOS	81

1. INTRODUÇÃO

A endometriose pélvica é uma afecção ginecológica inflamatória crônica, dependente de estrogênio, prevalente em 10 a 15% da população feminina durante a menacme. Pode ser definida como o crescimento do tecido endometrial, glândula e/ou estroma, em outros tecidos além do útero, que sofre a mesma mudança histológica cíclica do endométrio uterino. (RIAZI et al, 2015)

Patologia de difícil diagnóstico, exerce importante impacto negativo na saúde e bem-estar físico, mental e social das mulheres acometidas. Conhecida por suas repercussões associadas a uma grande variedade de sintomas como dismenorrea, dispareunia, dor pélvica e infertilidade. A endometriose tem sido estudada nos últimos anos, com o objetivo de esclarecer aspectos ainda não totalmente esclarecidos como fatores de risco, etiologia, prevenção, tratamento, infertilidade e recidivas. (SELI et al, 2003)

Vários estudos descrevem a relação entre as citocinas e a endometriose, pois as concentrações elevadas no fluido peritoneal de pacientes acometidas podem resultar de variações na síntese das mesmas por linfócitos, macrófagos, implantes ectópicos e células mesoteliais. As citocinas podem participar no desenvolvimento da doença em diferentes situações como a migração de macrófagos na cavidade peritoneal, a adesão das células endometriais ao peritônio, a adesão das células estromais à fibronectina e ainda na angiogênese para a manutenção dos implantes no peritônio. (HARADA et al, 2001)

Os efeitos protetores do exercício físico regular já foram amplamente descritos no tratamento de várias doenças inflamatórias crônicas. A atividade física moderada e regular pode aumentar os níveis sistêmicos de citocinas com propriedades anti-inflamatórias e melhorar as respostas do sistema imune. Apesar das atividades inflamatórias e imunomoduladoras serem bem conhecidas, não é possível apontar o real papel do exercício físico na endometriose com base na literatura científica atual. (BONOCHE et al, 2014)

Para elucidar se o exercício físico é capaz de interferir no desenvolvimento da doença, os estudos com modelos experimentais de endometriose se justificam por caracterizarem o curso da doença, além do tipo e intensidade de exercício físico com efeitos preventivos e curativos. (BONOCHE et al, 2014)

2. REVISÃO DA LITERATURA

Endometriose pélvica

A endometriose pélvica é uma doença crônica, inflamatória, estrogênio dependente, responsável por sintomas como dor pélvica, dismenorreia e infertilidade. Após décadas de pesquisa, algumas teorias para explicar o desenvolvimento da endometriose foram propostas, mas nenhuma alcançou a unanimidade. Duas antigas correntes de hipóteses sugerem sua etiopatogênese, a teoria da transformação de mesotélio em tecido endometrial, conhecida como metaplasia celômica, proposta em 1919 por Meyer e a mais aceita, chamada de teoria da menstruação retrógrada, descrita por Sampson em 1927, propôs que a endometriose resulta do implante de células endometriais provenientes de refluxo de sangue menstrual, originário da cavidade uterina para a cavidade abdominal, através das trompas. Porém achados recentes descrevem que para ocorrer a implantação de células endometriais, deve haver um ambiente hormonal favorável e condições imunológicas ineficazes na eliminação dessas células ectópicas, além de outros fatores como exposições ambientais, predisposição genética, estresse oxidativo e presença de inflamação sistêmica. (MEHEDINTU et al, 2014)

Desde as primeiras descrições, a endometriose tem se mostrado uma doença de difícil diagnóstico e abordagem terapêutica. As mulheres acometidas, na maioria das vezes, dependem de métodos invasivos tanto para o diagnóstico com confirmação histológica, como para o tratamento cirúrgico pela exérese das lesões. Os estudos atuais se concentram na pesquisa dos fatores em virtude dos quais as mulheres desenvolvem a doença, para que os esforços sejam direcionados a melhorar as formas de diagnóstico, tratamento e prevenção de recidivas. (AHN et al. 2015)

A inflamação é um fator de risco para várias doenças crônicas tais como aterosclerose, demências, artropatias, doenças inflamatórias intestinais e endometriose. No caso da endometriose é bem possível que a inflamação seja causa e também consequência. (HUGHES et al, 2015)

A reação inflamatória é o mecanismo de defesa do organismo contra uma lesão tecidual causada por agentes físicos, químicos ou biológicos. No processo

inflamatório, células imunologicamente competentes são acionadas para inativar ou destruir microrganismos, remover substâncias irritantes e proteínas antigênicas, além de iniciar a reparação dos tecidos. Este mecanismo de defesa geralmente é benéfico, porém efeitos indesejáveis ocasionados por uma resposta excessiva podem evoluir para lesão tecidual progressiva. (WEISS et al, 2009)

O início, a manutenção e o fim da resposta inflamatória são processos que envolvem vários tipos de células e mediadores humorais, além de inúmeras substâncias, sendo o grupo das citocinas o mais importante. As citocinas são polipeptídios secretados por diferentes células em resposta a microrganismos ou outros antígenos, que alteram funções em células alvo. Elas agem localmente ou em sítios distantes e podem regular importantes processos biológicos, como crescimento celular, ativação celular, inflamação, imunidade, reparação tecidual, fibrose e morfogênese. (MAYBINA; CRITCHLEYA; JABBOURB, 2011)

O processo inflamatório é desencadeado com a liberação de mediadores químicos que podem ser aminas, lipídios ou peptídeos e seus metabólitos que se originam nos tecidos atingidos e nas células migratórias. Esses mediadores provocam distúrbios na membrana celular que determinam a ativação de marcadores inflamatórios específicos e respostas imunológicas. (MALUTAN et al 2015)

Sistema imunológico e endometriose

Alterações do sistema imunológico, que não consegue identificar e destruir tecido endometrial ectópico estão entre as teorias sobre as causas da endometriose. Muitos estudos apontam alterações funcionais dos linfócitos em resposta aos antígenos nas portadoras de endometriose, que estão associadas a variações na liberação de citocinas que desempenham um papel decisivo na resposta imune e etiologia da doença. (PODGAEC et al, 2010)

Cada vez mais o papel do sistema imunológico na endometriose é foco das investigações científicas e muitas anormalidades têm sido observadas.

Na teoria da menstruação retrógrada, o raciocínio mais recente afirma que as células endometriais na cavidade peritoneal devem ser eliminadas pelo sistema imunológico antes de se implantarem e se isso não ocorrer adequadamente, a doença é desencadeada devido aos mecanismos de resposta imunológica celular e humoral. Participam da resposta imune celular, linfócitos T, macrófagos, monócitos e células *natural killer* (NK) e da resposta imune humoral, linfócitos B através da produção de anticorpos, que têm a função de neutralizar o antígeno indutor da disfunção. (ULUKUS *et* ARICI, 2005)

Células endometriais fora da cavidade uterina são identificadas como antígenos e alvos de reação imunológica local que envolve células como macrófagos, células NK e linfócitos T. Os macrófagos agem fagocitando e levando o antígeno aos linfócitos T, através das moléculas de histocompatibilidade (MHC) na superfície celular. Existem dois tipos de MHC, as moléculas de classe I e as de classe II. Quando o antígeno se liga à MHC de classe I, linfócitos T citotóxicos são atraídos e liberam substâncias letais responsáveis pela morte da célula alvo. Quando a ligação ocorre com a MHC de classe II, são atraídos os linfócitos T auxiliares que não possuem ação citotóxica direta, mas são capazes de secretar citocinas com diversas funções e estas citocinas podem ser fatores chave na etiopatogênese da endometriose. (BERKKANOGLU *et* ARICI, 2003)

As principais funções dos epitélios são proteção, absorção e secreção. As células epiteliais do endométrio secretam citocinas como IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-8 que participam das respostas imunológicas e são reguladoras das células T, que frequentemente estão alterados em mulheres com endometriose. As células T auxiliares (células Th) são um subgrupo de linfócitos que liberam citocinas e estas desempenham papel fundamental nas funções do sistema imunológico. As células Th se diferenciam em duas linhagens principais, a Th1 e a Th2, cada uma com diferentes funções e perfis de produção de citocinas. As células Th1 produzem IFN- γ , TNF- β e IL-2, que ativam macrófagos e são responsáveis pela imunidade mediada por células e pela proteção contra patógenos intracelulares. As células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, que promovem a imunidade humoral e são responsáveis pela produção de anticorpos, pela inibição de

macrófagos e pela proteção e contra patógenos extracelulares. Th1 e Th2 se desenvolvem de maneira antagônica para induzir as respostas imunes específicas e necessárias para cada situação. (PODGAEC *et al*, 2007)

Células Th1 e Th2

Na década de 80, Mosmann e Coffman observaram dois subtipos de linfócitos auxiliares, em ratos, com diferentes padrões na secreção de citocinas e outras funções. Desde então, outras pesquisas foram realizadas e tornaram os efeitos da resposta Th1 e Th2 em doenças uma importante área de pesquisa em sistema imunológico. Quanto à etiopatogenia da endometriose este parece ser um caminho bastante promissor. (MOSMANN et COFFMAN, 1989)

O contato dos linfócitos Th virgens (Th zero) com o antígeno, pode originar dois tipos de respostas, conhecidas como Th1 e Th2, que dependem de fatores como a natureza das células que apresentam o antígeno, da via de exposição ao mesmo, das citocinas envolvidas, da afinidade e interação do antígeno / complexo de histocompatibilidade / receptores dos linfócitos T. (ULUKUS et ARICI, 2005)

Quando ligado ao antígeno, se o linfócito Th virgem sofre estímulo de citocinas específicas como IL-2 e ocorre resposta imune Th1 que se caracteriza pela produção de TNF- α e IFN- γ , desencadeia um processo imune celular que envolve macrófagos, células “*natural killers*” (NK), linfócitos T citotóxicos e a secreção de outras citocinas. Quando há contato do antígeno com o linfócito Th virgem e estímulo de IL-4, ocorre a resposta Th2, que concursa com maior produção de IL-4, além da produção de IL-5, IL-10 e IL-13, que atraem linfócitos B e desencadeiam resposta imune humoral, produção de Imunoglobulina E e ativação de eosinófilos. (WU et al, 2000)

Os linfócitos T produzem citocinas que têm importantes funções no sistema imunológico, tanto em resposta celular aos antígenos intracelulares, que resulta na diferenciação dos linfócitos CD4 e CD8 em linfócitos T auxiliador tipo 1 (Th1) que se caracterizam pela produção de interferon gama (IFN- γ), fator de necrose

tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 2 (IL-2), como em resposta humoral a antígenos extracelulares que resulta na diferenciação linfócitos CD4 e CD8 em linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2) caracterizados pela produção de IL-4 e IL-10. (BENJAMINI et al, 2002)

As respostas das células Th1 e Th2 se inibem mutuamente, pois citocinas derivadas de Th1, como IFN- γ que inibe o desenvolvimento de células Th2, enquanto que citocinas derivadas de células Th2, como IL-4 e IL-10, suprimem respostas Th1. O equilíbrio Th1/Th2 é indicador das funções imunes e foco de várias investigações nas últimas décadas e por enquanto não há total consenso na literatura quanto a todas as suas implicações. Relatos associam o desequilíbrio Th1/Th2 a várias disfunções orgânicas e patologias. (BENJAMINI et al, 2002)

As repostas Th1 e Th2 podem ocorrer ao mesmo tempo, mas há uma predominância de uma ou de outra, de acordo com a situação e com as citocinas presentes. Células Th1 atuam contra células neoplásicas, agentes patogênicos intracelulares e na resposta de hipersensibilidade tardia a antígenos virais e bacterianos, já as células Th2 agem na proteção contra patógenos extracelulares. (MOSMANN et COFFMAN, 1989)

O equilíbrio entre células Th1 e Th2 pode contribuir para o mecanismo de defesa imunológica contra a endometriose, pois geralmente as células T têm atividade diminuída na endometriose, especialmente as células Th1 e o aumento dos níveis de citocinas específicas como IL-4 e IL-5 na endometriose favorece o domínio da função das células Th2, que resulta em desequilíbrio imunológico. (Wu et Ho, 2003)

A relação Th1 e Th2 pode também ser associada à infertilidade, pois para que a gestação não seja reconhecida pela mãe como um corpo estranho, são produzidas células e citocinas pelas células da resposta Th2, aumentando as concentrações de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 durante a gravidez normal. Mulheres que apresentam falha na implantação embrionária parecem apresentar um desvio no equilíbrio das repostas Th1/Th2, apresentando uma maior resposta Th1. Em pacientes com endometriose, ainda não há pleno conhecimento sobre as

interações específicas entre as citocinas envolvidas e a predominância de cada tipo de resposta linfocitária. (MILLER et al, 2016)

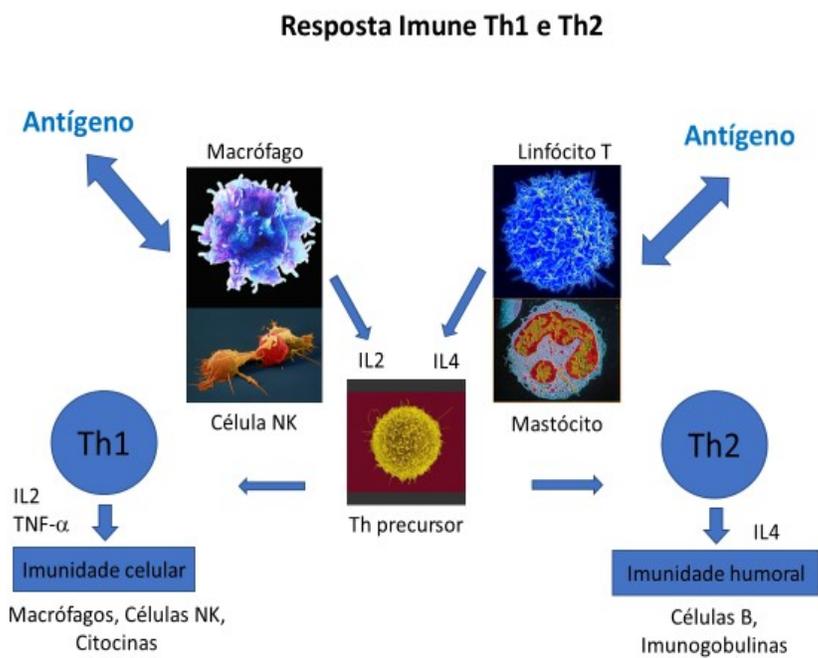


Figura 1. Resposta imune Th1/Th2 (adaptada de BENJAMINI *et al*, 2002).

Quando as células dos tecidos linfóides secundários encontram um antígeno, podem liberar citocinas que estimulam os linfócitos Th0 (precursores) que são capazes de se diferenciar em células inflamatórias Th1 ou em células auxiliares Th2, que se diferenciam pelas citocinas que produzem (Figura 1). Uma célula Th0 se torna Th1 ou Th2 por ação das citocinas no meio, que são influenciadas pelo antígeno. Alguns antígenos estimulam a produção de IL-4 que levam a formação de células Th2 enquanto que outros antígenos aumentam a produção de IL-2, que favorece a geração de células Th1. As citocinas produzidas pelas células Th1 ativam macrófagos e participam na geração de células T, resultando em uma resposta imune mediada por células. As citocinas produzidas pelas células Th2 ajudam a ativar células B, resultando na imunidade humoral com a produção de anticorpos. (BENJAMINI *et al*, 2002)

Citocinas e endometriose

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular e participam de diferentes etapas da resposta imune como mitose, angiogênese, quimiotaxia, e diferenciação celular, atuam como mensageiras e reguladoras da atividade de células do sistema imune. Neste grupo de substâncias estão incluídas, entre outras, as chamadas interleucinas (IL), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). (HARADA et al, 2001)

A família IL-1 compreende várias citocinas pró-inflamatórias, geralmente produzidas por monócitos, macrófagos, células endoteliais, musculares lisas e plaquetas ativadas. Pacientes com endometriose podem apresentar níveis aumentados de IL-1 no fluido peritoneal. A IL-1 β induz a produção de fatores angiogênicos como o VEGF e a IL-6 em células estromais ectópicas, possivelmente por inibição da atividade dos macrófagos, células NK e linfócitos T citotóxicos ou através de atividade da proteína ligada à inibição da proliferação endometrial. (KRÁLÍČKOVÁ et VETVICKA, 2015)

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, envolvida no desenvolvimento da hiperinsulinemia, que desempenha papel importante no metabolismo de carboidratos e lipídios por aumentar a lipólise, inibir a lipase lipoprotéica (LPL) e aumentar a liberação de ácidos graxos livres e glicerol. Produzida por monócitos e células endoteliais, pode iniciar uma resposta de fase aguda durante o processo inflamatório. Desempenha uma gama de funções nos efeitos imunológicos, celulares e humorais relacionados à inflamação como a produção e elevação das concentrações plasmáticas de fibrinogênio, proteína amilóide sérica A (SAA) e particularmente da proteína C reativa (PCR). (SHINOHARA et al, 2012)

A endometriose é uma doença que resulta de alterações no sistema imunológico em virtude da resposta inflamatória na qual citocinas específicas como a IL-6 estão envolvidas. A IL-6 promove a ativação de linfócitos T, diferenciação dos linfócitos B e estimula a proliferação de células endometriais humanas. Níveis séricos e no fluido peritoneal de IL-6 estão elevados em

pacientes com endometriose e esses valores têm sido correlacionados com o grau de gravidade da doença. (MARTÍNEZ *et al*, 2007)

Fator de necrose tumoral- α (TNF- α)

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória com ação autócrina, parácrina e endócrina. Produzido principalmente por monócitos, linfócitos e macrófagos ativados, capaz de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α adicional. Independente de sua origem, está diretamente envolvido na ação de células NK, linfócitos T citotóxicos, secreção de VEGF e metaloproteinases, além de desempenhar um papel importante na apoptose em locais de inflamação. Envolvido na fisiologia da proliferação do endométrio, pode ter papel central nas manifestações locais e sistêmicas de endometriose, inclusive nas recidivas após a depuração cirúrgica das lesões. (MALUTAN *et al*, 2015)

O TNF- α está elevado no fluido peritoneal de mulheres com endometriose e que as concentrações estão relacionadas com a fase, intensidade dos sintomas e prognóstico da doença, com papel central nas manifestações locais e sistêmicas, pois promove o crescimento de células endometriais. Além disso, alguns estudos exploraram a associação dos polimorfismos de TNF- α com a endometriose e essa linha cada vez mais encontra respaldo na literatura, particularmente com o foco nas variações epigenéticas. (LEE *et al*, 2008)

Interleucina-2 (IL-2)

Uma das mais estudadas citocinas inflamatórias, a IL-2 é uma glicoproteína bem caracterizada e com funções conhecidas. Fator condicional na regulação da resposta imune, pois sua secreção inicia uma cascata de citocinas que inclui outras interleucinas, interferons e fatores de necrose tumoral, com efeitos

sinérgicos e inibitórios sobre a sua própria atividade no sistema imunológico. A principal função da IL-2 no sistema imune é a proliferação de elementos como célula T e células B antígeno-dependentes, células NK e macrófagos. (MALUTAN *et al*, 2015)

Derivadas dos linfócitos T que podem afetar as funções dos linfócitos B, macrófagos, células NK e linfócitos T. A síntese e liberação dessas citocinas ocorre nas células T, tanto nas Th1 quanto nas Th2. Os linfócitos Th1 dependem da IL-12 para a sua diferenciação e liberação de IL-2 e IFN- γ que facilitam a resposta imune ao induzir reações inflamatórias e ativar as funções microbidas dos macrófagos. As células Th2 precisam de IL-4 para a sua diferenciação com posterior liberação de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, e IL-13 que ajudam as células B a produzir complemento para fixar anticorpos. (Wu *et Ho*, 2003)

Interleucina 4 (IL-4)

A IL-4 é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias, produzida por linfócitos T, mastócitos, eosinófilos e basófilos que tem importantes funções no sistema imune. Atua sobre os linfócitos T e B, células NK, mastócitos e células endoteliais e induz a diferenciação de linfócitos B para sintetizar imunoglobulinas necessárias para respostas alérgicas e anti-helmínticas. Age sobre macrófagos ativados inibindo os efeitos das citocinas IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 e aumenta a suscetibilidade aos efeitos dos glicocorticoides nos mesmos. Tem potencial antioxidante e terapêutico em muitas situações clínicas inflamatórias, alérgicas e neoplásicas. (MALUTAN *et al*, 2015)

Secretada por células Th2, afeta vários tipos de células em vários estágios de sua diferenciação através alteração da síntese de outras citocinas e também atua como um fator de crescimento autônomo para células Th2. Durante a ativação do sistema imunológico a IL-4 desempenha um papel fundamental na inibição da proliferação celular de Th-1, se opõe aos efeitos do IFN- γ em

macrófagos e inibe a ativação de células T e células NK dependentes de IL-2 através de inibição do receptor de IL-2. (Wu *et* Ho, 2003)

Atividade física

A atividade física regular é reconhecida como importante estratégia não somente para prevenir, mas para melhorar e até mesmo curar algumas doenças inflamatórias crônicas e metabólicas que ameaçam a qualidade de vida mundial. Esses efeitos ocorrem em virtude da redução de tecido adiposo visceral, com consequente diminuição na liberação de adipocinas que induzem um ambiente pró-inflamatório, além da contração das fibras musculares que tem grande capacidade de alterar o meio inflamatório local a médio e longo prazo. (GLEESON *et al*, 2011)

Na circulação sanguínea as citocinas desencadeiam funções do sistema imunológico, tanto em resposta à inflamação, quanto em desordens neuroendócrinas, metabólicas e sistêmicas. As miocinas, produzidas pelo músculo esquelético durante o exercício, estão intimamente envolvidas na promoção da saúde do organismo e podem proporcionar, através da liberação de mediadores químicos, efeito pró-inflamatório ou anti-inflamatório. Em particular, o efeito benéfico do exercício físico a longo prazo pode ser explicado em parte, pelo efeito anti-inflamatório do exercício agudo, mediado inicialmente pela produção de IL-6. (FARINHA *et al*, 2015)

Os estudos que relatam os efeitos preventivos e terapêuticos da atividade física para doenças inflamatórias crônicas não transmissíveis, descreverem que o exercício consegue suprimir a entrada das citocinas pró-inflamatórias no plasma e reduzir a velocidade do ciclo da inflamação. Segundo a teoria mais aceita, o exercício libera IL-1 e TNF- α que levam ao aumento de IL-6 e essa induz a síntese dos receptores antagônicos à IL-1 e TNF- α , que resultam na liberação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10. (BRUUNSGRARD, 2005)

O aumento de IL-6 após o exercício agudo induz a síntese de receptores antagônicos e parece resultar na elevação dos níveis sistêmicos de citocinas com propriedades anti-inflamatórias, como a IL-10 que suprime a entrada de citocinas pró-inflamatórias no plasma. (FEBBRAIO, 2007) O tipo, duração e intensidade do exercício são fatores primordiais para o perfil da resposta das citocinas pós-exercício. Um exemplo disto é a liberação de IL-1, que parece ser mais sensível à intensidade do exercício, enquanto que TNF- α e IL-6 são mais sensíveis à duração do exercício. (TIBANA et al, 2014)

IL-6 aumenta imediatamente em resposta ao exercício e diminui no período pós-exercício. O aumento plasmático de IL-6 está relacionado com a duração do exercício, já que o RNAm da IL-6 é regulado pela contração muscular e a transcrição deste gene é desencadeada pelo exercício. Alguns fatores como baixos níveis de glicogênio muscular e aumentos da formação de espécies reativas de oxigênio estimulam o a liberação de IL-6, enquanto que a suplementação com carboidratos inibe o aumento de IL-6 induzido pelo exercício porque afeta a expressão do RNAm para IL-6. (ABD EL-KADER et al, 2013)

Outro mecanismo é a ativação da via proteína quinase ativada por AMP (AMPk) que depende da IL-6. A atividade da AMPk estimula vários mecanismos, que aumentam a geração de ATP, incluindo oxidação de ácidos graxos e transporte de glicose na musculatura esquelética. (WOODS et al, 2009)

O exercício físico inibe a produção de fatores pró-inflamatórios como TNF- α e IL-1 β , estimula a produção de IL-1ra e IL-10, induz a liberação de receptores solúveis de TNF- α e a expressão de proteínas com propriedades anti-inflamatórias. Portanto em longo prazo pode ser atribuído ao exercício resposta anti-inflamatória, mediada pela IL-6 derivada do músculo esquelético. (FARINHA et al, 2015)

Exercícios físicos intensos podem levar a trauma tecidual que estimula as células locais a produzir citocinas, que levam a diferenciação de células Th2 e elevam os níveis de hormônios de stress como cortisol e catecolaminas, os quais podem inibir a produção de IL-12, principal indutor de células Th1, e aumentar as respostas de linfócitos Th2. Exercícios moderados induzem a regulação negativa

do nível estacionário dos receptores beta2-adrenérgicos nos macrófagos e reduzem os efeitos supressores das catecolaminas na produção de IL-12, que resultam em aumento da regulação das respostas Th1. (ZHAO *et al*, 2012)

Na literatura há evidências que as respostas dos linfócitos Th1 são suprimidas após exercícios de alta intensidade, que podem fornecer explicação para o aumento da susceptibilidade a doenças após a prática prolongada exercício de alta intensidade. Em contraste, as respostas dos linfócitos Th1 são reforçadas após exercícios de moderada intensidade e melhoram as respostas imunológicas do organismo. No entanto, o mecanismo deste efeito imunomodulador, das atividades físicas, não é completamente conhecido. (GHOLAMNEZHAD *et al*, 2014)

Existe também a hipótese que as atividades recreativas e ocupacionais podem reduzir os níveis de estrogênio e que os exercícios extremos reduzem a frequência das ovulações. Além do mais a prática de atividade física pode aumentar os níveis da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG), que por si só pode reduzir os estrogênios biodisponíveis. A atividade física reduz a resistência à insulina, o que pode também resultar em redução nas concentrações de estrogênios e ainda parece ter efeitos protetores sobre doenças que envolvem processos inflamatórios e estresse oxidativo, pois aumenta os níveis sistêmicos de citocinas anti-inflamatórias. Levando em consideração essas hipóteses fisiológicas e suas consequências, 6 estudos incluídos numa revisão sistemática sugerem que a prática de atividade física pode reduzir o risco, a progressão e o agravamento da endometriose, particularmente as atividades de maior intensidade. Porém não são suficientes para promover a cura definitiva e os resultados não foram conclusivos. (BONOCHEER *et al*, 2014)

Uma meta-análise recente, que incluiu seis estudos tipo caso-controle e três estudos de coorte, que totalizaram 3355 casos de atividade atual e 4600 casos de atividade pregressa. Embora os achados apontem que a prática de atividade física pode reduzir o risco de endometriose e suas complicações, os mesmos não apoiam conclusivamente essa hipótese, pois existem efeitos positivos em quase todo sistema de órgãos, mediados por citocinas, com efeitos

anti-inflamatórios diretos e indiretos em doenças inflamatórias crônicas, porém os exercícios não impedem a progressão da endometriose. Indicou a necessidade de mais estudos, considerando a atividade física quanto à intensidade, frequência, modalidade, incluindo as atividades ocupacionais e de lazer associadas a outros fatores determinantes da endometriose, como o status econômico, padrão menstrual e fertilidade, para elucidar essas questões. (RICCI *et al*, 2016)

3. JUSTIFICATIVA

Esse estudo experimental foi idealizado em virtude da falta de pesquisas experimentais ou clínicas, com resultados específicos, que relatem as eventuais influências da prática de atividade física em portadoras de endometriose; Doença crônica, de alta prevalência, que até o momento não conta com protocolos de tratamento específicos e cura definitiva.

O projeto tem vistas a fornecer subsídios e resultados que possam nortear pesquisas clínicas em humanas, para proporcionar futuras opções profiláticas e alternativas terapêuticas para esta patologia, que afeta sobremaneira mulheres jovens, em idade produtiva, comprometendo-as com custo social imensurável.

4. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi observar se há influência da prática de atividades físicas e suas modalidades, em ratas submetidas à endometriose experimental.

Objetivos específicos

- Avaliação da área dos implantes de endometriose, antes e após realização do protocolo de atividades físicas.
- Avaliação histológica dos implantes de endometriose, após a eutanásia.
- Avaliação dos níveis séricos de citocinas inflamatórias, no sangue coletado antes e após realização do protocolo de atividades físicas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo caracterizou-se metodologicamente como experimental, sendo que os experimentos foram realizados seguindo as normas e princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a aprovação do Núcleo de Bioética do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - protocolo nº 774 – 1ª versão). No Biotério da PUC-PR, as ratas foram colocadas em gaiolas apropriadas, com controle de temperatura, umidade e luminosidade, recebendo água e ração. Após três dias elas foram submetidas à procedimento cirúrgico para indução da doença.

Cirurgia para indução da endometriose

Modelos experimentais são essenciais para as pesquisas na área da saúde. A escolha de ratas como modelo ocorreu em virtude do baixo custo, da facilidade de manejo, da resistência dos animais às doenças e do robusto respaldo na literatura usando modelo murino com técnica descrita cirúrgica por Jones em 1984, a mais utilizada na literatura mundial. A indução da endometriose é um procedimento simples, eficaz e replicável, fator fundamental para avaliar a validade e viabilidade de novas propostas terapêuticas. (DO AMARAL et al, 2009)

No estudo foram incluídas 40 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, todas com três meses de idade, virgens e peso variado entre 215g e 251g, submetidas à cirurgia para indução da endometriose, que após o procedimento para avaliação dos implantes, realizaram um protocolo de atividades físicas distribuídas aleatoriamente em quatro grupos, por um período de 8 semanas. Após o término, considerando os óbitos ocorridos durante o experimento, o N de cada grupo ficou, 8 no grupo 1 com atividade anaeróbica, 9 no grupo 2 com atividade aeróbica, 9 no grupo 3 com atividade mista e 10 no grupo 4 o controle, que totalizaram 36 modelos encaminhadas à eutanásia para coleta de tecidos e análise dos resultados.

A técnica cirúrgica para indução de endometriose peritoneal consistiu em laparotomia após jejum de 12 horas, anestesia com injeção intraperitoneal da

mistura de 1 ml de ketamina (50mg/ml) com 1ml de xilazina (20mg/ml), 0,2ml para cada 100g de peso, tricotomia da região abdominal e antissepsia. Com o modelo animal em posição cirúrgica, a incisão foi longitudinal na linha Alba de aproximadamente 2 cm para identificação do útero bicornio. Ligadura dos vasos sanguíneos com fio Vicryl 3-0, no corno uterino esquerdo, para ressecção de fragmento do terço médio de 5x5mm (0,25cm²), que foi aberto longitudinalmente, suturado ao peritônio parietal com face endometrial exposta à cavidade abdominal, por fio Mononylon 6-0. Finalizada com a verificação hemostática e fechamento dos planos.

Duas ratas vieram a óbito pela indução anestésica, sendo uma do Grupo 1 (atividade anaeróbica) e outra do Grupo 2 (atividade aeróbica).

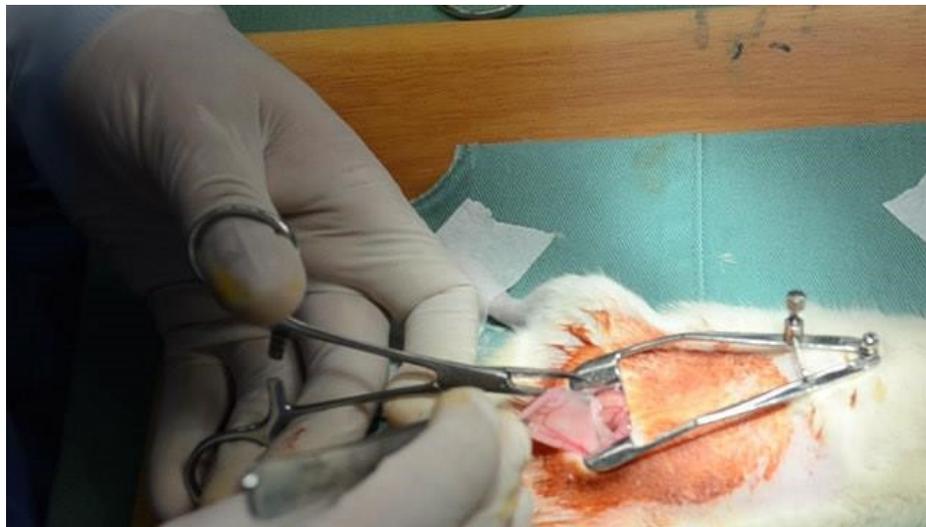


Figura 2. Indução da endometriose: Após incisão longitudinal na linha Alba, identificação do corno uterino esquerdo.

Os animais foram encaminhados ao biotério até a reabertura.

Cirurgia de reabertura

Após 21 dias as ratas foram pesadas e submetidas à cirurgia de reabertura para verificar os implantes endometriais. O implante encontrado foi medido em milímetros com o auxílio de um paquímetro, para verificar a evolução da indução de endometriose.

Ocorreu o óbito de uma rata do Grupo 3 (atividades aeróbia e anaeróbica) durante a indução anestésica.

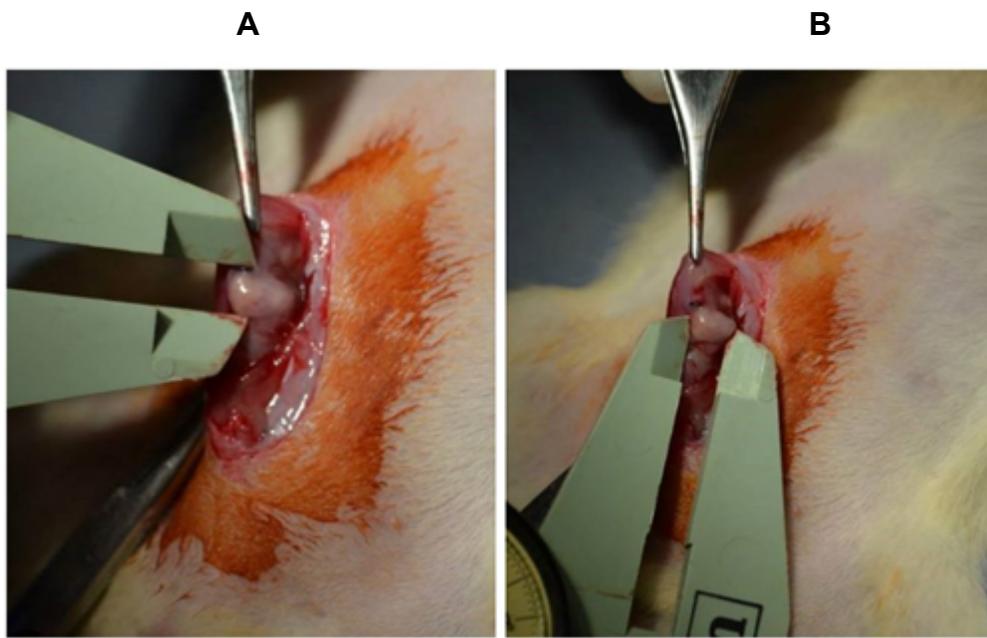


Figura 3. Cirurgia de reabertura e medida dos implantes peritoneais (A e B).

Início das atividades físicas

Após 48 horas da reabertura, as ratas iniciaram as atividades físicas conforme divisão dos grupos. Na primeira semana foram feitas adaptações diárias dos animais aos equipamentos. Conforme o grupo, as ratas ficavam 30 min correndo na esteira ergométrica e/ou 10 min em nado livre na piscina sem coletes de peso. Da 2ª a 9ª semana foram submetidas a um protocolo de exercícios e as atividades se estenderam por um período de 8 semanas com frequência de 3 vezes por semana, sempre às segundas, quartas e sextas.

O cálculo do período de treinamento levou em consideração as diferenças fisiológicas e de desenvolvimento biológico entre humanas e as modelos animais escolhidas, que se tornam sexualmente maduras com cerca de seis semanas de idade e durante idade adulta. Vários autores realizaram trabalhos experimentais em ratos e afirmaram existir correspondência de 30 dias de vida do homem para cada dia de vida do rato, portanto cada mês de vida das ratas é aproximadamente equivalente a 2,5 anos das humanas e o período de 8 semanas do protocolo ao que foram submetidas, equivale a quase 5 anos em humanas. (ANDREOLLO et al, 2012)

Tabela 1: Correlação dias/anos da idade dos ratos em relação a dos humanos

Total de vida:	13,8 dias no rato	= 1 ano no humano
Período de amamentação:	42,4 dias no rato	= 1 ano no humano
Período de puberdade:	4,3 dias no rato	= 1 ano no humano
Período da adolescência:	10,5 dias no rato	= 1 ano no humano
Fase adulta:	11,8 dias no rato	= 1 ano no humano
Fase idosa:	17,1 dias no rato	= 1 ano no humano
Média:	16,7 dias no rato	= 1 ano no humano

Adaptado de ANDREOLLO, 2012.

Os grupos e a dinâmica do estudo

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, da seguinte forma:

Grupo 1 – atividade física anaeróbia (n=10)

Grupo 2 – atividade física aeróbia (n=10)

Grupo 3 – atividade física aeróbia e anaeróbia (n=10)

Grupo 4 – controle (n=10)

O Grupo 1 realizou atividade anaeróbia com saltos na piscina, com colete de peso ajustado ao tórax de carga calculada pelo percentual do peso do animal, no mínimo 20%, e aumentadas conforme pesagem, variando entre 25g, 50g e 75g.



Figura 4. Coletes de peso para a prática de atividade física anaeróbia.

As ratas do Grupo 1 realizaram 3 séries de 12 saltos com coletes na piscina.

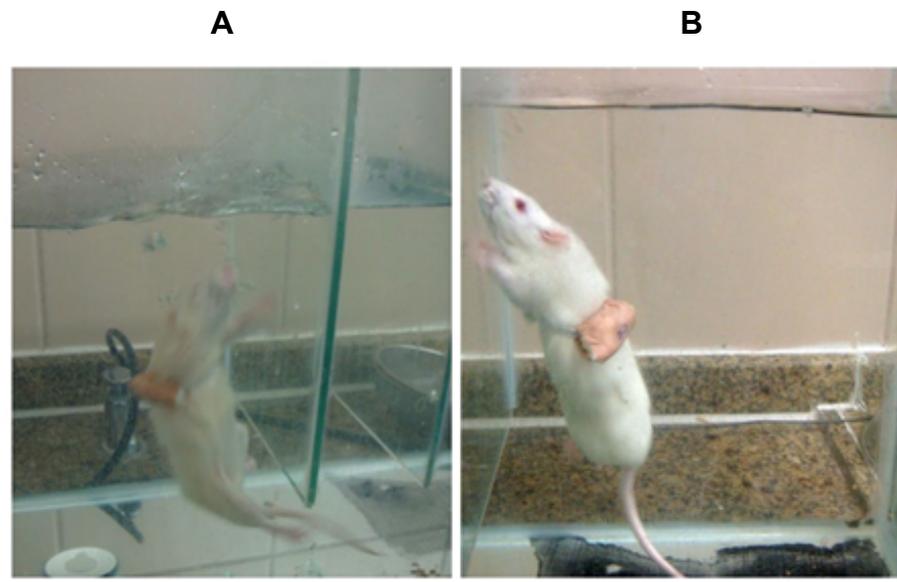


Figura 5. Atividade anaeróbica: Rata do Grupo 1 em dois momentos: em A, indo ao fundo da piscina e em B, realizando um salto.

Na última semana de atividade física uma rata do Grupo 1 (atividade anaeróbica) veio a óbito no Biotério da PUC-PR por causas naturais.

O Grupo 2 realizou as atividades aeróbicas, compreendida por caminhada na esteira por um período de 60 minutos.

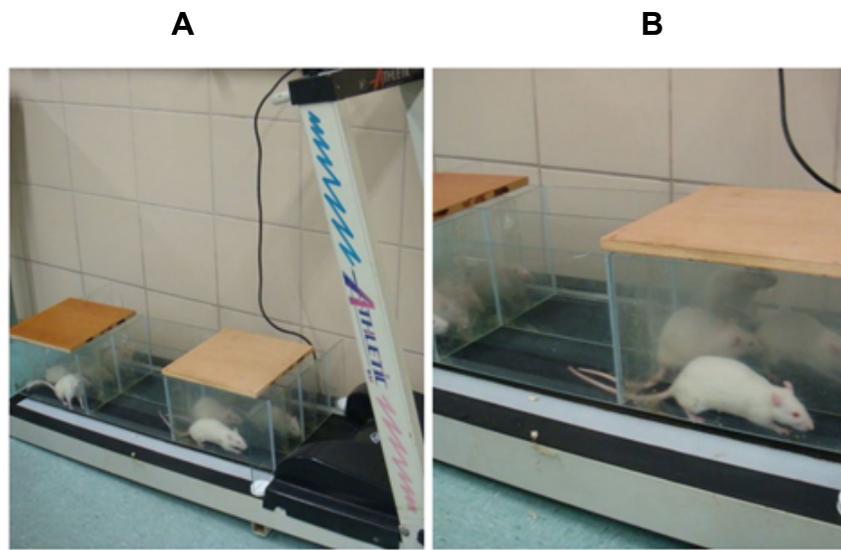


Figura 6. Atividade aeróbica: Grupo 2 realizando 60 min de atividade física na esteira ergométrica (A e B).

As ratas do Grupo 3 realizaram atividades aeróbica e anaeróbica combinadas, sendo esteira ergométrica por 60 minutos e 3 séries de 12 saltos na piscina com colete de peso.

O mesmo tempo de nove semanas foi respeitado às ratas do Grupo 4, que durante a realização das atividades físicas permaneceram no Biotério.

Após o término das atividades físicas e considerando os óbitos ocorridos durante o experimento, o N de cada grupo ficou da seguinte forma:

Tabela 2. Grupos do experimento e seu N final.

	TIPO DE ATIVIDADE	N
GRUPO 1	Anaeróbia	8
GRUPO 2	Aeróbia	9
GRUPO 3	Mista (ambas atividades)	9
GRUPO 4	Controle	10

N = número de ratas

Eutanásia

Realizada a terceira intervenção cirúrgica, na 10^a semana, por lapatomia para visualização, medição e ressecção dos implantes. As ratas foram novamente pesadas e submetidas à eutanásia, com coleta de sangue, Papanicolau, histerectomia e retirada do músculo sóleo.

Os implantes endometriais foram fixados em formol, processados para inclusão em parafina e analisados histologicamente no Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR, que constatou a presença de células de endométrio em todos os implantes.

Análise das citocinas

Realizada através do método de imunofluorescência com o kit Luminex[®] Novex da Life Thecnologie, Mouse Cytokine Magnetic 10-Plex Panel, no Núcleo Interdisciplinar de Meio Ambiente NIMA PUC-PR.

Foram analisadas as amostras do sangue coletado na reabertura e eutanásia das 36 ratas, divididas nos 4 grupos e medidas as seguintes citocinas, Interleucina 1 beta (IL-1 β), Interleucina 2 (IL-2), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 5 (IL-5), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10), Interleucina 12 (IL-12), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interferon gama (IFN- γ), Fator de estímulo de colônias de granulócitos macrófagos (GM-CSF) com variações estatisticamente significativas observadas nos níveis de IL-2, IL4 e TNF- α .



Figura 7. Kit Luminex[®] Novex da Life Thecnologie

O Kit Luminex[®] foi recebido e acondicionado sob refrigeração no Núcleo Interdisciplinar de Meio Ambiente NIMA PUC-PR.



Figura 9. Equipamentos Laboratório NIMA PUC-PR.

Separados todos os equipamentos necessários para as análises laboratoriais como: Pipetas de precisão ajustáveis calibradas, tubos de polipropileno para diluir soluções, folha de alumínio, centrífuga, sonicador ultrassônico, misturador vortex, lavador de placa automatizado, agitador orbital.



Figura 10. Separação das amostras.

As amostras de sangue coletado na reabertura e na eutanásia, que estavam armazenadas a -80 graus centígrados no NIMA PUC-PR, foram separadas e catalogadas conforme a planilha de dados.



Figura 11. Preparação da placa.

A placa foi preparada em conformidade com as orientações descritas na bula do Kit Luminex[®].

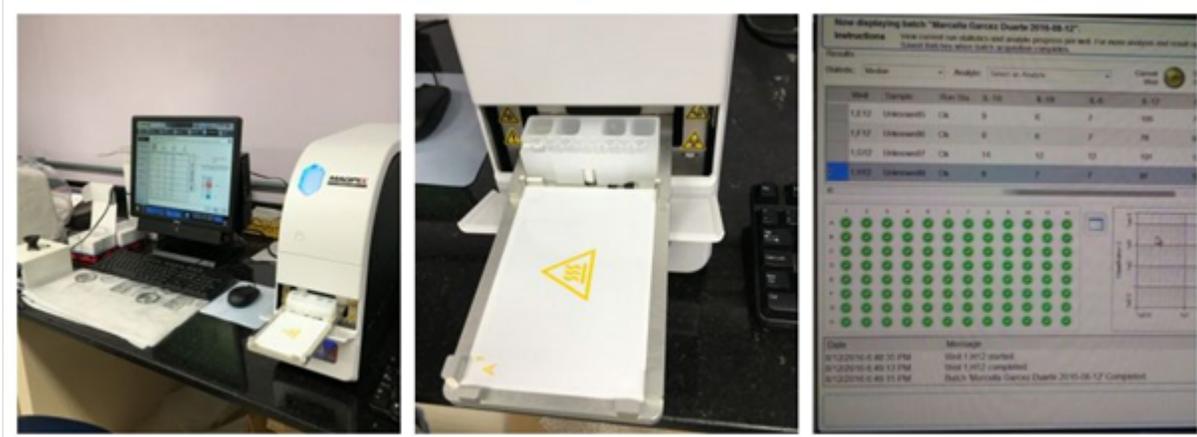


Figura 12. Leitura da placa.

Realizada a leitura da placa no sistema Magpix[®] através do software de aquisição e análise de dados, conforme os parâmetros do fabricante.

Análise estatística

Os resultados de variáveis quantitativas foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões.

A comparação entre os resultados das avaliações na reabertura e na eutanásia, dentro de cada grupo, foram feitas usando-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.0. Os resultados do Keenan foram descritos por frequências e percentuais.

Para a comparação dos grupos em relação às variáveis quantitativas foi usado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

6. RESULTADOS

Crescimento dos implantes

O aumento dos implantes sugere o sucesso da cirurgia de indução da doença e o desenvolvimento da endometriose nas ratas. A não alteração indica que houve controle no desenvolvimento, ou que o tempo foi insuficiente para desenvolver a doença em sua totalidade.

Tabela 3. Área dos implantes das ratas após 21 dias da cirurgia. (p = 0,140) *

	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
G1 – Anaeróbica	8	0,35	0,33	0,25	0,49	0,08
G2 – Aeróbica	9	0,38	0,36	0,25	0,64	0,12
G3 – Mista	9	0,30	0,30	0,25	0,40	0,05
G4 – Controle	10	0,29	0,30	0,16	0,35	0,05

A taxa de crescimento dos implantes peritoneais entre a primeira cirurgia para a indução da endometriose e a cirurgia de reabertura em 21 dias é demonstrada no gráfico abaixo. Pela observação macroscópica, a taxa de desenvolvimento da doença foi de 100% e o crescimento dos implantes de endometriose foi de 80,5%.

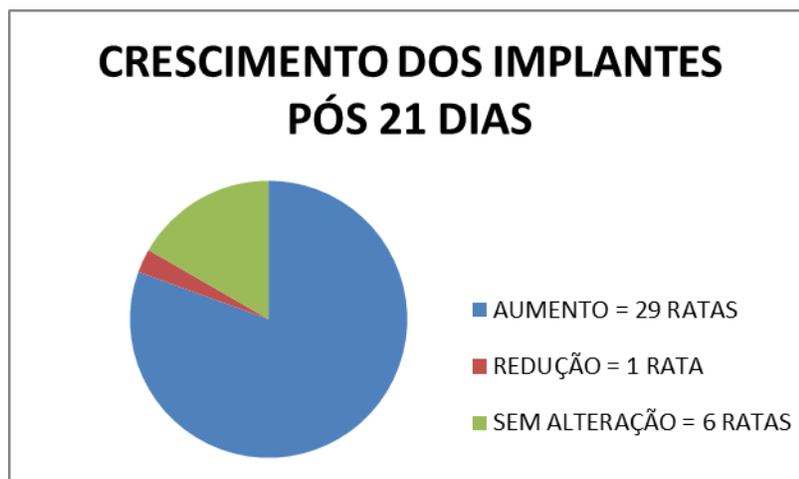


Figura 13. Crescimento dos implantes peritoneais 21 dias após indução cirúrgica.

Avaliação dos pesos no início, na reabertura e na eutanásia**Tabela 4.** Avaliações de peso e diferenças de pesos entre as fases de avaliação.

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Peso Inicial	G1- Anaeróbica	8	240,88	242,00	224,00	251,00	8,64	0,132
	G2- Aeróbica	9	236,00	237,00	222,00	246,00	6,98	
	G3- Mista	9	231,11	230,00	215,00	243,00	8,85	
	G4- Controle	10	233,00	235,50	213,00	246,00	10,02	
Peso Reabertura	G1- Anaeróbica	8	251,50	252,50	236,00	264,00	8,38	0,566
	G2- Aeróbica	9	245,44	248,00	232,00	255,00	7,73	
	G3- Mista	9	247,89	238,00	232,00	269,00	14,08	
	G4- Controle	10	251,30	253,50	232,00	264,00	10,44	
Peso Eutanásia	G1- Anaeróbica	8	285,38	283,00	260,00	320,00	18,41	0,235
	G2- Aeróbica	9	269,67	268,00	256,00	291,00	11,09	
	G3- Mista	9	273,67	272,00	249,00	310,00	17,28	
	G4- Controle	10	275,70	271,00	261,00	313,00	15,66	
Diferenças peso	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Dif Peso R/I	G1- Anaeróbica	8	10,63	10,50	3,00	18,00	6,30	0,272
	G2- Aeróbica	9	9,44	10,00	5,00	15,00	2,96	
	G3- Mista	9	16,78	9,00	-3,00	46,00	19,04	
	G4- Controle	10	18,30	20,00	4,00	37,00	10,12	
Dif Peso E/I	G1- Anaeróbica	8	44,50	37,00	27,00	74,00	16,84	0,574
	G2- Aeróbica	9	33,67	34,00	19,00	55,00	10,75	
	G3- Mista	9	42,56	36,00	19,00	83,00	20,55	
	G4- Controle	10	42,70	38,50	15,00	89,00	20,28	
Dif Peso E/R	G1- Anaeróbica	8	33,88	31,00	23,00	56,00	11,63	0,397
	G2- Aeróbica	9	24,22	21,00	10,00	50,00	11,95	
	G3- Mista	9	25,78	21,00	2,00	53,00	15,59	
	G4- Controle	10	24,40	21,50	11,00	52,00	12,83	

*ANOVA com um fator, $p < 0,05$

Para cada uma das avaliações de peso e para as diferenças entre as avaliações, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais nos 4 grupos, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um grupo tem média diferente dos demais.

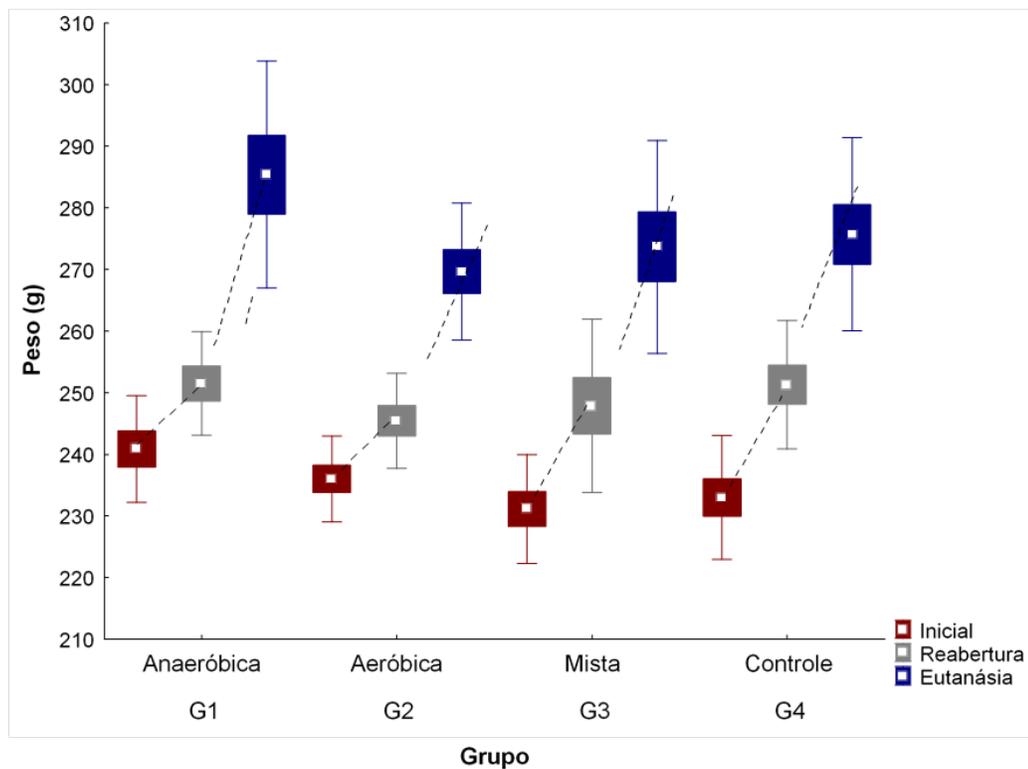


Figura 14. Avaliações dos pesos e as diferenças entre as avaliações. Estatísticas descritivas de acordo com os grupos e os valores de $p < 0,05$.

Resultados dos pesos para cada grupo

O grupo 1, que praticou atividade anaeróbica, apresentou o maior ganho ponderal médio ao final do programa.

O Grupo 2, que praticou atividade aeróbica, teve menor ganho de peso durante todo o protocolo do estudo.

O Grupo 3, que somou as atividades anaeróbica e aeróbica, apresentou ganho de peso médio dentro do padrão de todos os grupos.

O Grupo 4 não apresentou variação média de pesos fora do padrão dos outros grupos.

Comparação dos grupos em relação à área dos implantes

Tabela 5. Áreas dos implantes (cm²) de cada grupo, nos momentos de avaliação.

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
Área Implante I	G1- Anaeróbica	8	0,25	0,25	0,25	0,25	0,00
	G2- Aeróbica	9	0,25	0,25	0,25	0,25	0,00
	G3- Mista	9	0,25	0,25	0,25	0,25	0,00
	G4- Controle	10	0,23	0,25	0,15	0,25	0,04
Área Implante R	G1- Anaeróbica	8	0,35	0,33	0,25	0,49	0,08
	G2- Aeróbica	9	0,38	0,36	0,25	0,64	0,12
	G3- Mista	9	0,30	0,30	0,25	0,40	0,05
	G4- Controle	10	0,29	0,30	0,16	0,35	0,05
Área Implante E	G1- Anaeróbica	8	0,34	0,25	0,12	1,00	0,28
	G2- Aeróbica	8	0,26	0,30	0,09	0,30	0,08
	G3- Mista	9	0,28	0,25	0,16	0,42	0,09
	G4- Controle	10	0,32	0,25	0,12	0,72	0,18

* Teste não-paramétrico de Wilcoxon, $p < 0,05$

A área dos implantes peritoneais entre a cirurgia de reabertura, em 21 dias, e a eutanásia está demonstrada no gráfico a seguir.

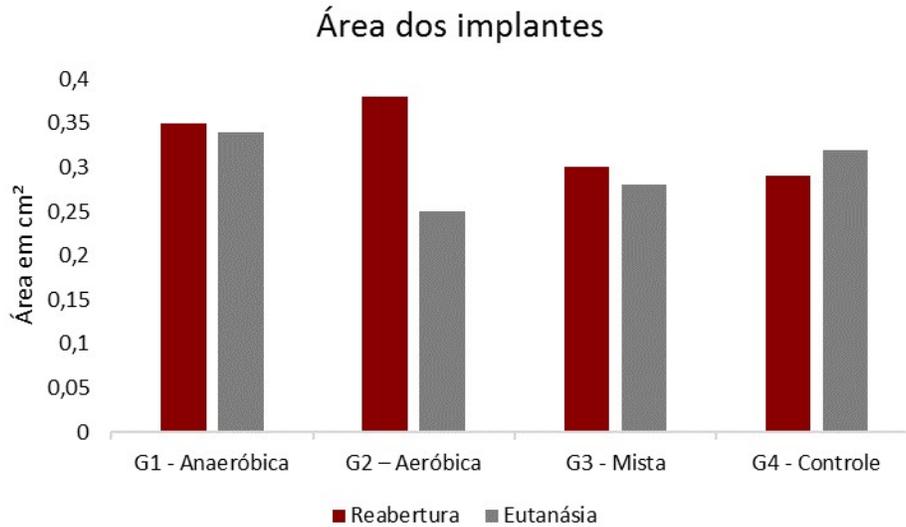


Figura 15. Áreas dos implantes em cada grupo na reabertura e na eutanásia.

Resultados das áreas dos implantes na reabertura e a eutanásia

O grupo 1 apresentou discreta redução média na área dos implantes, quando comparados às mesmas na reabertura e na eutanásia.

O Grupo 2 foi o grupo em que houve a maior redução na área dos implantes, entre a reabertura e a eutanásia.

O Grupo 3 teve discreta redução na área dos implantes durante o protocolo de atividades físicas

O Grupo 4 foi o único no qual se observou discreto aumento na área dos implantes medidos na eutanásia, quando comparados com a área dos implantes da reabertura.

Análise histológica

As lâminas dos implantes foram coradas com HE (hematoxilina e eosina), analisadas ao microscópio óptico para a confirmação de tecido endometrial e classificadas segundo o método de Keenan (KEENAN *et al*, 1999).

Keenan 0 - nenhum epitélio

Keenan 1 - epitélio mal preservado com células epiteliais ocasionais

Keenan 2 - epitélio moderadamente preservado com infiltrado leucocitário

Keenan 3 - camada epitelial bem preservada

Para efeito de análise estatística o Keenan foi dividido em dois grupos:

Keenan = 0 e Keenan > 0.

Avaliação do Keenan na eutanásia

Na tabela abaixo são apresentados os resultados obtidos a partir da hipótese nula de independência entre as classificações de Keenan (0 ou maior do que 0) e os 4 grupos, versus a hipótese alternativa de dependência.

Tabela 6. Percentuais de Keenan por grupo, na eutanásia.

	Keenan 0	Keenan 1, 2 Ou 3	Total
G2 – Anaeróbica	50,0% (4)	50,0% (4)	8
G1 – Aeróbica	22,2% (2)	77,8% (7)	9
G3 – Mista	55,6% (5)	44,4% (4)	9
G4 – Controle	50,0% (5)	50,0% (5)	10

*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p = 0,480$

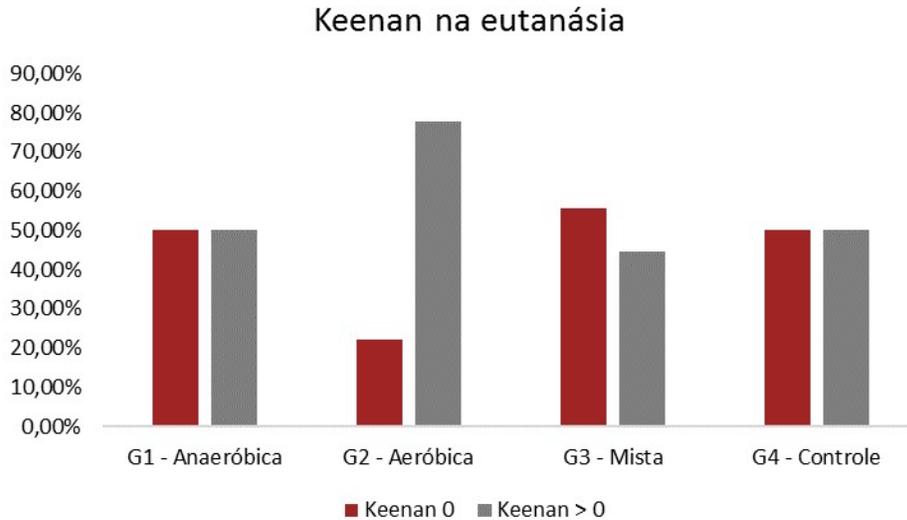


Figura 16. Percentuais de Keenan por grupo na eutanásia.

Resultados do Keenan para cada grupo

O grupo 1 segundo a avaliação histológica pelo método Keenan, teve a mesma quantidade de modelos com Keenan 0 e Keenan >0 na eutanásia.

O Grupo 2, foi o grupo que apresentou na eutanásia a maior mediana do índice Keenan, portanto na eutanásia ainda havia células endometriais nas áreas dos implantes.

O Grupo 3 de todos os grupos, foi o que apresentou a menor mediana do índice Keenan, na eutanásia.

O Grupo 4 apresentou 50% dos implantes classificados como Keenan 0 e 50% como Keenan >0.

Análise dos resultados de TNF- α

Inicialmente, para cada uma das avaliações de TNF- α e para as diferenças entre as avaliações, testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais nos 4 grupos, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um grupo tem resultados diferentes dos demais. Na tabela abaixo são apresentadas estatísticas descritivas de acordo com os grupos e os valores de p dos testes estatísticos.

Para a diferença R-E valores negativos indicam que houve redução no valor de TNF- α e valores positivos indicam aumento.

Tabela 7. Avaliações de TNF- α e as diferenças entre as avaliações por grupo.

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
TNF- α R	G1- Anaeróbica	8	75,38	21,79	8,34	436,55	147,16	
	G2- Aeróbica	9	10,27	9,79	8,34	12,67	1,25	
	G3- Mista	9	12,15	9,79	8,34	29,62	6,65	
	G4- Controle	10	12,23	11,23	9,79	16,95	2,87	
TNF- α E	G1- Anaeróbica	8	27,54	10,51	8,34	131,87	42,57	0,459
	G2- Aeróbica	9	18,26	9,79	8,34	78,94	22,97	
	G3- Mista	9	13,82	8,34	8,34	46,24	12,73	
	G4- Controle	10	15,71	8,34	8,34	53,10	15,98	0,080
DIF TNF- α (R-E)	G1- Anaeróbica	8	- 47,85	- 11,28	- 304,68	2,88	104,79	
	G2- Aeróbica	9	8,00	0,00	- 4,33	69,16	23,15	
	G3- Mista	9	1,67	- 1,45	- 9,83	36,45	13,37	
	G4- Controle	10	3,48	- 1,45	- 8,61	37,57	14,47	0,283

*Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

Em seguida, dentro de cada grupo, testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais na avaliação de reabertura e na avaliação na eutanásia, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na tabela abaixo são apresentados os valores de p dessas comparações.

Tabela 8. Valores de p para as comparações do TNF- α .

Grupo	Valor de p (Reabertura x Eutanásia)
G1- Anaeróbica	0,116
G2- Aeróbica	0,612
G3- Mista	0,161
G4- Controle	0,396

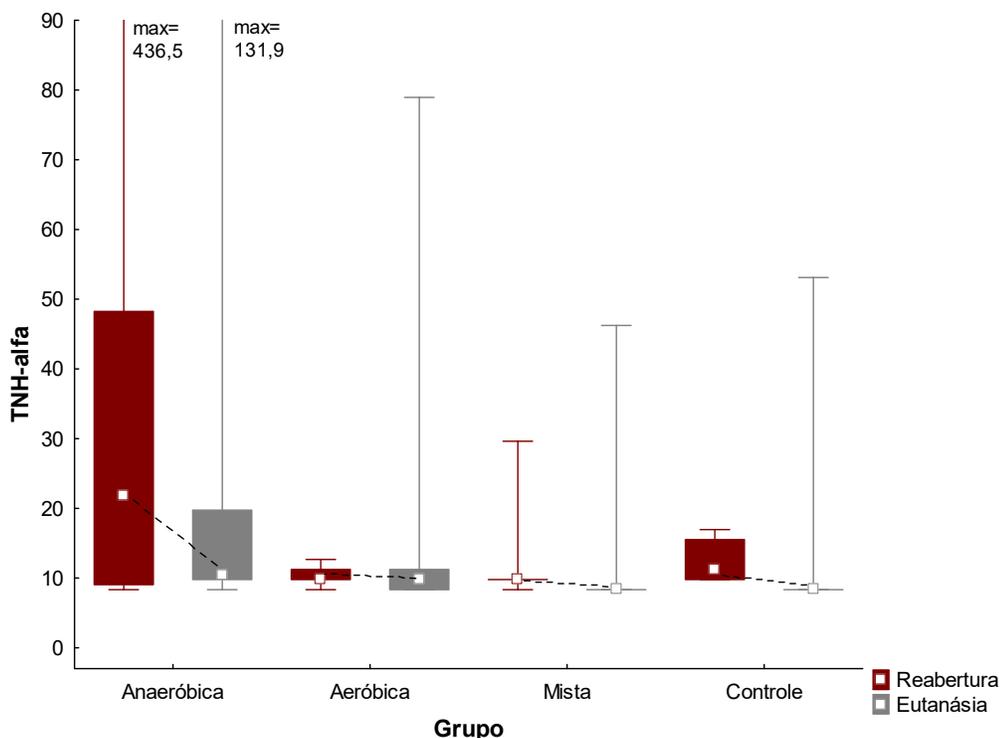


Figura 17. Mediana do TNF- α por grupo, na reabertura e na eutanásia.

Resultados de TNF- α para cada grupo

O grupo 1 foi o que apresentou as maiores alterações dos índices de TNF- α , tanto na reabertura como na eutanásia. No momento da reabertura os índices de TNF- α estavam significativamente mais altos que os índices de TNF- α dos outros grupos. Também foi observada nesse grupo, a maior redução dos níveis de TNF- α entre a reabertura e a eutanásia.

O Grupo 2 teve na análise laboratorial dos níveis observados, para o TNF- α , baixos ou não detectáveis tanto na reabertura como na eutanásia.

O Grupo 3 foi o que apresentou as menores variações nos níveis de TNF- α medidos nas amostras coletadas, antes e depois dos protocolos de exercícios.

O Grupo 4 apresentou níveis de TNF- α que estavam discretamente aumentados na reabertura e praticamente indetectáveis na eutanásia.

Análise dos resultados de IL-2

Para cada uma das avaliações de IL-2 e para as diferenças entre as avaliações, testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais nos 4 grupos, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um grupo tem resultados diferentes dos demais. Na tabela abaixo são apresentadas estatísticas descritivas de acordo com os grupos e os valores de p dos testes estatísticos.

Para a diferença R-E valores negativos indicam que houve redução no valor de IL-2 e valores positivos indicam aumento.

Tabela 9. Avaliações de IL-2 e as diferenças entre as avaliações por grupo.

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
IL-2 R	G1- Anaeróbica	7	40,91	20,21	14,34	104,96	39,22	0,007
	G2- Aeróbica	9	13,23	11,40	0,65	32,27	10,35	
	G3- Mista	9	25,64	23,17	0,65	46,77	15,75	
	G4- Controle	10	8,42	7,97	0,65	17,82	5,17	
IL-2 E	G1- Anaeróbica	8	114,33	27,85	3,37	381,98	143,33	0,348
	G2- Aeróbica	9	22,55	10,33	5,15	105,59	32,17	
	G3- Mista	9	21,04	12,42	0,65	67,49	20,46	
	G4- Controle	10	15,41	9,15	0,65	46,28	14,38	
DIF IL-2 (R-E)	G1- Anaeróbica	7	88,80	15,19	- 101,59	367,63	159,25	0,422
	G2- Aeróbica	9	9,32	0,00	- 21,94	78,98	29,26	
	G3- Mista	9	- 4,59	-3,08	- 46,12	23,45	22,91	
	G4- Controle	10	6,99	0,59	- 5,43	38,31	15,11	

*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

Para a avaliação na reabertura, foi encontrada diferença significativa entre os grupos em relação ao IL-2.

Na tabela abaixo são apresentados os valores de p^* dessas comparações.

Tabela 10. Comparações entre os valores de p dos grupos para a IL-2.

Grupos comparados	Valor de p^*
G1- Anaeróbica e G2- Aeróbica	0,024
G1- Anaeróbica e G3- Mista	0,683
G1- Anaeróbica e G4- Controle	0,002
G2- Aeróbica e G3- Mista	0,044
G2- Aeróbica e G4- Controle	0,280
G3- Mista e G4- Controle	0,003

Em seguida, dentro de cada grupo, testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais na avaliação de reabertura e na avaliação na eutanásia, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes.

Na tabela abaixo são apresentados os valores de p^* dessas comparações.

Tabela 11. Valores de p para as comparações da IL-2.

Grupo	Valor de p^* (Reabertura X Eutanásia)
G1-Anaeróbica	0,237
G2-Aeróbica	0,575
G3-Mista	0,594
G4-Controle	0,386

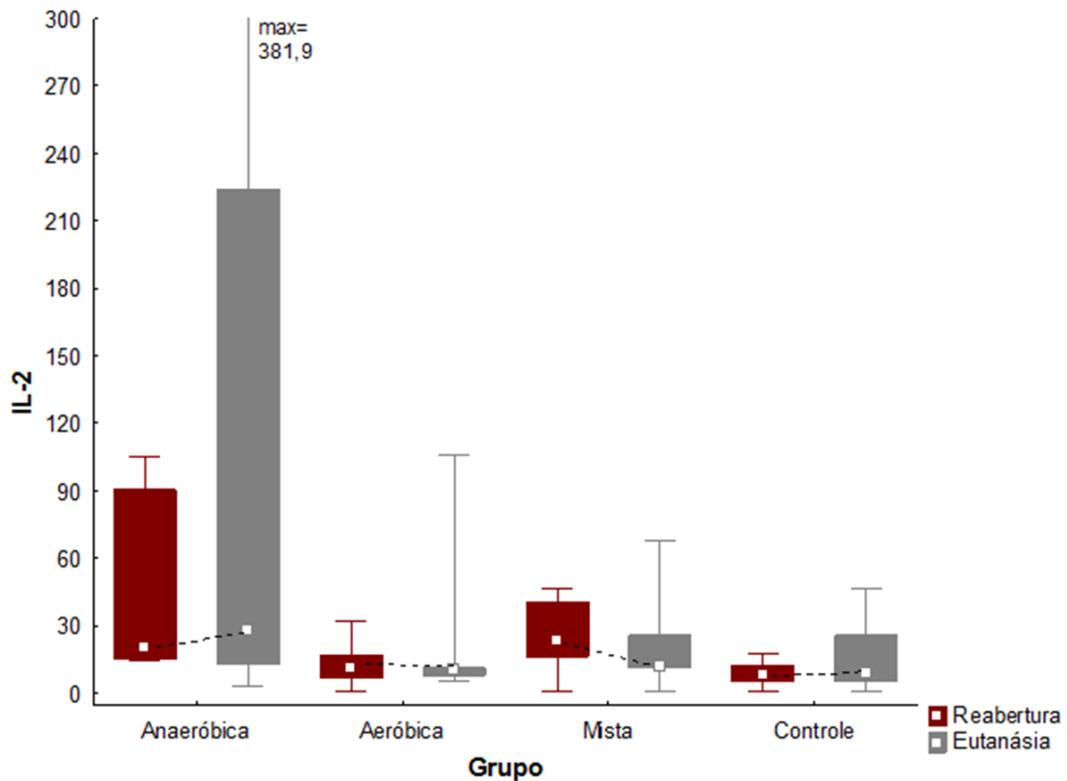


Figura 18. Mediana da IL-2 por grupo, na reabertura e na eutanásia.

Resultados de IL-2 para cada grupo

O grupo 1 foi o que também apresentou os maiores níveis no momento da reabertura, porém diversamente dos índices de TNF- α , os níveis médios de IL-2 apresentaram grande aumento no momento da eutanásia.

O Grupo 2 na análise laboratorial, teve os níveis de IL-2 baixos ou não detectáveis tanto na reabertura como na eutanásia.

O Grupo 3 apresentou discreto aumento nos níveis médios de IL-2 nas amostras da reabertura.

O Grupo 4 estava com índices de IL-2 na reabertura muito baixos e apresentaram pequeno aumento na eutanásia.

Análise dos resultados de IL-4

Para cada uma das avaliações de IL-4 e para as diferenças entre as avaliações, testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais nos 4 grupos, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um grupo tem resultados diferentes dos demais. Na tabela abaixo são apresentadas estatísticas descritivas de acordo com os grupos e os valores de p dos testes estatísticos.

Para a diferença R-E valores negativos indicam que houve redução no valor de IL-4 e valores positivos indicam aumento.

Tabela 12. Avaliações de IL-4 e as diferenças entre as avaliações por grupo.

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
IL-4 R	G1-Anaeróbica	8	16,52	14,68	9,73	29,39	6,53	0,557
	G2-Aeróbica	9	23,05	17,15	9,73	55,98	16,66	
	G3-Mista	9	19,27	14,69	7,23	53,57	13,69	
	G4-Controle	10	14,04	11,59	7,23	26,95	7,34	
IL-4 E	G1-Anaeróbica	8	101,93	19,61	7,23	666,75	228,88	0,016
	G2-Aeróbica	9	32,01	12,21	4,72	106,08	38,05	
	G3-Mista	9	12,75	12,21	7,23	19,61	4,25	
	G4-Controle	10	7,22	7,23	4,72	12,21	2,50	
DIF IL-4 (R-E)	G1-Anaeróbica	8	85,41	3,68	- 14,83	637,36	223,88	0,228
	G2-Aeróbica	9	8,96	- 2,50	- 29,25	79,13	37,23	
	G3-Mista	9	- 6,52	0,00	- 43,84	7,40	15,54	
	G4-Controle	10	- 7,57	- 6,22	- 22,24	2,50	8,35	

*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

Para a avaliação na eutanásia, foi encontrada diferença significativa entre os grupos em relação ao IL-4 encontrada. Sendo assim, os grupos foram comparados dois a dois.

Na tabela abaixo são apresentados os valores de p dessas comparações.

Tabela 13. Comparações entre os valores de p dos grupos para a IL-4.

Grupos comparados	Valor de p*
G1- Anaeróbica e G2- Aeróbica	0,543
G1- Anaeróbica e G3- Mista	0,410
G1- Anaeróbica e G4- Controle	0,002
G2- Aeróbica e G3- Mista	0,822
G2- Aeróbica e G4- Controle	0,008
G3- Mista e G4- Controle	0,014

Em seguida, dentro de cada grupo, testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais na avaliação de reabertura e na avaliação na eutanásia, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes.

Na tabela abaixo são apresentados os valores de p dessas comparações.

Tabela 14. Valores de p para as comparações da IL-4.

Grupo	Valor de p* (Reabertura x Eutanásia)
G1- Anaeróbica	0,310
G2- Aeróbica	0,636
G3- Mista	0,176
G4- Controle	0,021

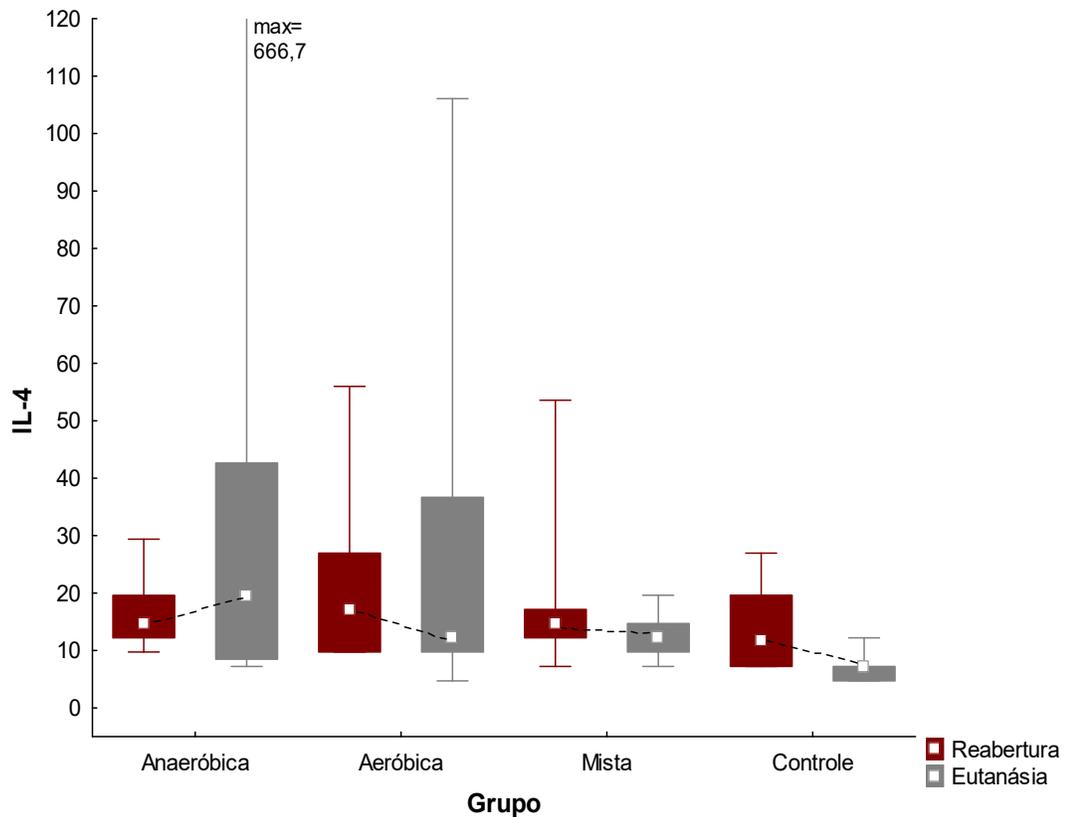


Figura 19. Mediana da IL-4 por grupo, na reabertura e na eutanásia.

Resultados de IL-4 para cada grupo

O grupo 1, que praticou atividade anaeróbica, no momento da reabertura apresentava níveis médios semelhantes aos outros grupos, porém no momento da eutanásia apresentava os índices expressivamente aumentados,

O Grupo 2, quanto aos níveis de IL-4, esses estavam aumentados na reabertura e continuaram aumentando com a prática de atividade física, pois apresentaram níveis ainda maiores na eutanásia.

O Grupo 3, foi o que apresentou as menores variações nos níveis de IL-4 medidas nas amostras coletadas, antes e depois dos protocolos de exercícios.

O Grupo 4, o controle, apresentou níveis de IL-4 que estavam um pouco aumentados na reabertura e nas amostras coletadas na eutanásia estavam em níveis bem reduzidos.

7. DISCUSSÃO

Os tratamentos disponíveis para a endometriose, até o momento, além de não oferecem eficácia ampla e duradoura, podem ter sérios efeitos colaterais associados. O foco desse estudo foi investigar se a atividade física tem alguma ação benéfica nas alterações bioquímicas e histofisiológicas resultantes da resposta às de citocinas inflamatórias, a fim de encontrar novas possibilidades profiláticas e terapêuticas.

A relação entre as citocinas e a endometriose foi objetivo de pesquisas que encontraram fortes indícios do envolvimento das mesmas em diferentes aspectos do desenvolvimento da doença, desde a migração de macrófagos na cavidade peritoneal, passando pelo estímulo da adesão do estroma à fibronectina, a fixação da célula endometrial ao peritônio, a ação de enzimas que degradam a matriz celular e finalmente a manutenção do implante por estímulo da angiogênese. (MAYBINA et al, 2011)

É sabido que prática de atividade física regular pode contribuir tanto como ferramenta terapêutica coadjuvante como de forma preventiva para o desenvolvimento doenças, particularmente às relacionadas a processos inflamatórios crônicos. Para a endometriose não há consenso quanto ao impacto entre a prática ou não de atividade física, apesar de ser uma patologia que envolve inflamação. Tampouco existem referências quanto ao tipo e intensidade de exercícios que poderiam atuar nas mulheres acometidas e essas foram as questões motivaram o desenho desse projeto de pesquisa.

Inúmeros estudos descrevem os efeitos positivos da prática de atividade física para o organismo, porém durante ou após os exercícios físicos ocorre um aumento do consumo de oxigênio pelos tecidos e há ativação de vias metabólicas que podem resultar na formação de espécies reativas de oxigênio. Essas moléculas têm sua liberação aumentada nos exercícios de alta intensidade e estão relacionadas a um grande número de doenças e disfunções. Os exercícios físicos são uma conhecida forma de estresse que pode disparar adaptações em resposta à maior produção de radicais livres, que levam a uma série de reações no organismo que podem ser benéficas ou não. (RICCI et al, 2016)

As análises dos implantes

Os resultados relativos aos pesos iniciais, na reabertura e na eutanásia das ratas apontaram que o grupo 1 teve maior ganho ponderal médio, particularmente no período que compreendeu a prática de atividade física. A comparação do peso nos três momentos resultou em aumento de peso médio em todos os grupos proporcionalmente, de modo que se pôde constatar que os modelos não sofreram prejuízo alimentar, nem apresentaram outras doenças durante o experimento que pudessem comprometer o resultado. Não houve relevante diferença estatística entre os grupos e as comparações estão evidenciadas em tabelas anexas.

Quanto a área dos implantes, o principal parâmetro analisado no primeiro tempo do estudo, ocorreu aumento apenas do início ao 21º dia, durante o desenvolvimento da doença e após esse período houve regressão da área dos implantes. Portanto dos 21 dias até a eutanásia, houve redução na área dos implantes nos grupos que praticaram atividades físicas, mas no grupo controle, que não foi submetido ao protocolo de exercícios, houve aumento na média do tamanho dos implantes. Segundo a análise estatística, o grupo em que houve a maior redução, de 27%, foi o que realizou a atividade aeróbica, porém os outros grupos que realizaram atividades físicas também tiveram diminuição dos implantes endometriais, em sugestão de que a atividade física pode reduzir o foco da doença. A comparação entre os resultados das avaliações na reabertura e na eutanásia, de cada grupo, foi feita usando o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.0.

Outra análise foi a anatomopatológica proposta por Keenan em 1999, que comparou os quatro grupos segundo a classificação histológica semi-quantitativa de Keenan (0 ou > 0) feita pelo teste de Qui-quadrado com as duas classificações (0 ou > 0) e comparou em relação à área com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Dezesesseis animais apresentaram escore zero, o que conceitualmente não poderia caracterizar a endometriose, visto que essa é uma doença caracterizada pela presença de tecido glandular e/ou estromal fora da

cavidade uterina. Os resultados de Keenan foram descritos por frequências e percentuais. Para a comparação dos grupos em relação às variáveis quantitativas foi usado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e não houve significância estatística.

Apesar do modelo experimental, técnica e parâmetros analisados serem padronizados e bem descritos na literatura, o trabalho apresentava como limitação o fato de não terem sido mensurados e quantificados os níveis das citocinas pró e anti-inflamatórias, que poderiam apresentar alterações em função do tipo e intensidade do exercício aplicado. Assim começou a segunda fase do estudo, para desvendar os impactos bioquímicos da atividade física no organismo com endometriose.

O método laboratorial

Foi eleito o método laboratorial que utiliza a técnica de imunofluorescência com o kit Luminex® Novex da Life Technologie, Mouse Cytokine Magnetic 10-Plex Panel, para mensurar os níveis de citocinas nos modelos experimentais, pela possibilidade de avaliar um número maior de citocinas que os outros métodos e a não necessidade de utilização de laboratórios externos. Através dele foram analisadas as amostras do sangue coletado na reabertura e na eutanásia das 36 ratas e realizadas as medidas das concentrações das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ e GM-CSF, a partir de 0,5 ml de sangue armazenados a - 80° C, no NIMA PUC-PR. Após a análise dos dados, variações estatisticamente significativas foram observadas nos níveis de TNF- α , IL-2 e IL-4.

Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

Grupo 1: No momento da reabertura os índices mais altos entre os outros grupos, sugeriu maior resposta inflamatória. Esses níveis estavam muito mais elevados em quatro indivíduos deste grupo na reabertura, fato que além do aumento das citocinas esperado pelo desenvolvimento da doença, pode ser sugestivo de contaminação. Na eutanásia observada a maior redução, que sinalizou impacto da atividade física anaeróbica sobre as citocinas inflamatórias.

Grupo 2: Níveis baixos ou indetectáveis, sugestivos de baixa atividade inflamatória.

Grupo 3: Apresentou as menores variações nos níveis das citocinas.

Grupo 4: Levemente aumentados na reabertura, sugestivo de perfil inflamatório pelo desenvolvimento da doença e indetectáveis na eutanásia.

A análise das citocinas, das amostras da reabertura, revelou um grande aumento nos níveis séricos de TNF- α nas amostras coletadas no procedimento de reabertura no grupo 1, portanto antes da prática do protocolo de atividades. Os demais grupos apresentavam discreto aumento dos níveis séricos de TNF- α , semelhante entre eles e dentro do esperado para o período de desenvolvimento da endometriose. Considerando que uma maior concentração de TNF- α pode ser um marcador de resposta Th1, o grupo 1 pode ter iniciado o protocolo de atividade física em desequilíbrio Th1/Th2 de resposta imune. (PODGAEC et al, 2010)

Após as 8 semanas de atividade anaeróbica o grupo 1 teve grande redução dos níveis de TNF- α , quando comparados com os níveis séricos no início das atividades. Os demais grupos, que não apresentavam TNF- α alterado no início das atividades, não tiveram mudanças significativas nos níveis no momento da eutanásia.

Interleucina 2 (IL-2)

Grupo 1: Os maiores níveis no momento da reabertura, sugestão da atividade inflamatória no desenvolvimento da endometriose, porém os níveis aumentaram na eutanásia, provavelmente em decorrência da resposta imune celular.

Grupo 2: Níveis baixos ou não detectáveis tanto na reabertura como na eutanásia, sugestivos de baixa atividade inflamatória.

Grupo 3: Discreto aumento nos níveis nas amostras da reabertura com redução da eutanásia.

Grupo 4: Os índices que na reabertura estavam muito baixos, apresentaram pequeno aumento na eutanásia.

A utilização da dosagem da IL-2 como método auxiliar para o diagnóstico laboratorial da endometriose pode encontrar valores de sensibilidade de 90% e especificidade de 67%, quando dosados em sangue periférico. (BEDAIWY et al, 2002)

A análise da IL-2, citocina pró-inflamatória de resposta Th1, teve valores aumentados no grupo 1, nas amostras coletadas na reabertura e níveis mais que dobrados na eutanásia, que sugeriram resposta do sistema imune, pois a IL-2 é envolvida na comunicação celular já que sua secreção dá início a uma cascata de ativação em diversas citocinas incluindo interferon, fator de necrose tumoral e outras interleucinas, com efeitos sinérgicos e inibitórios no sistema imune. A grande função da IL-2 no sistema imunológico dos vertebrados é a proliferação clonal de células como as células T e células B antígeno dependente, *natural killers* e macrófagos.

Nos demais grupos as variações dos níveis não foram expressivas, tanto nas amostras coletadas na reabertura, como nas amostras coletadas na eutanásia. Este achado sugere a ausência ou pequena resposta pró-inflamatória mediada por IL-2, justamente os grupos nos quais os níveis de TNF- α não se apresentaram elevados no momento da reabertura.

Interleucina 4 (IL-4)

Grupo 1: Na reabertura os níveis semelhantes aos outros grupos, porém no momento da eutanásia apresentou índices expressivamente aumentados, que sugerem atividade anti-inflamatória mediada pela prática de atividade física.

Grupo 2: Níveis aumentados na reabertura que aumentaram mais na eutanásia, indicativos da ativação do sistema imune humoral para combater as células ectópicas.

Grupo 3: Foi o que apresentou os menores níveis e variações das citocinas, indicativos de baixa resposta imune.

Grupo 4: Os níveis que estavam pouco aumentados na reabertura, na eutanásia estavam bem reduzidos.

O presente estudo descobriu que nas ratas que praticaram atividade física anaeróbica, havia um nível sérico significativamente maior de TNF- α e IL-2 em comparação com os outros grupos, tanto na reabertura como na eutanásia. Também observou níveis de atividade que IL-4 maiores nos grupos com atividade física anaeróbica e aeróbica, nas amostras de sangue coletado em ambos os tempos, que nos grupos de atividade mista e controle, que indicaram maior atividade de resposta imune, em consequência da prática do protocolo.

A IL-4 é uma citocina anti-inflamatória produzida por células Th2 e a explicação para os níveis elevados de IL-4 nas ratas dos grupos 1 e 2, pode ser a resposta imunológica humoral secundária na tentativa de evitar a adesão se estiver em equilíbrio com a resposta imune celular Th1. Lembrando que se a resposta Th2 estiver exacerbada, pode estimular ainda mais a proliferação celular que leva a endometriose.

Uma das nossas principais limitações é representada pelo fato de que as demais citocinas analisadas não apresentaram taxas detectáveis, por isso não conseguimos desenhar conclusões sobre as implicações das mesmas.

Equilíbrio Th1 / Th2

Muitas pesquisas estudaram o papel do sistema imunológico na fisiopatologia da endometriose e vários foram os achados. O principal atualiza a teoria do refluxo menstrual, com o argumento de que as células endometriais extravasadas para a cavidade peritoneal devem ser expurgadas pelo sistema de defesa do organismo, já que não pertencem àquele local. Porém, mulheres com endometriose tem alguma falha no processo de limpeza e remoção dessas células que permite a implantação e o desenvolvimento das mesmas na cavidade peritoneal.

As teorias de desequilíbrio Th1 / Th2 estão apoiadas no conceito de que os linfócitos T *helper* estão envolvidos com dois padrões diferentes de secreção de citocinas. As células Th1 estimulam a produção de IL-2, IFN-gama e TNF- α citocinas que promovem a ação de células NK e macrófagos e as células Th2 que estimulam a liberação de IL-4 e IL-10, que promovem a ativação das células B. Uma resposta imune Th1 aumentada, pode ser associada ao desenvolvimento de patologias inflamatórias, enquanto que um padrão de resposta Th2 predominante está presente em doenças alérgicas. (PODGAEC *et al*, 2010)

Um predomínio de um padrão de resposta imune Th1 ou Th2 pode ser associado a inúmeras situações clínicas. Na endometriose o equilíbrio Th1 / Th2, portanto a coexistência de ambas as respostas parece ser um dos fatores condicionais para o não desenvolvimento da doença. Nos quadros com infiltração profunda, a imunidade celular parece predominar, pela ação de células Th1 que liberam enzimas e citocinas que provocam adesão, infiltração e manutenção dos focos de tecido endometrial ectópico. Entretanto existem pacientes com endometriose, com predominância de IL-4 e IL-10 que refletem uma mudança para a resposta imune humoral Th2 que estimula a proliferação celular. Esses achados permitiram concluir que a endometriose é uma doença inflamatória que envolve um possível predomínio de resposta imune, Th1 ou Th2. (PODGAEC *et al*, 2007)

Atividade física e endometriose

Na literatura disponível não é possível apontar se há e qual o real impacto da atividade física na endometriose, assim os estudos com modelos experimentais se justificam para tentar demonstrar o papel dos exercícios sobre a prevenção e o tratamento da doença, porque parecem permitir a caracterização de tempo e curso da mesma. Nesse tipo de projeto, além de elucidar se a atividade física é realmente capaz de interferir no desenvolvimento da doença, é possível determinar o tipo de atividade e intensidade necessária para que o exercício físico seja utilizado de forma benéfica. (BONOCHE *et al*, 2014; RICCI *et al*, 2016)

O estudo revelou a participação do sistema imunológico nas etapas do processo e pode relacionar a endometriose como uma doença autoimune e que a prática de atividade física regular e moderada pode ter impacto positivo na prevenção e manejo terapêutico, enquanto que exercícios excessivos podem ser responsáveis pelo agravamento da doença por desequilíbrio das respostas imunológicas Th1 e Th2.

8. CONCLUSÕES

Com os achados obtidos neste estudo é possível concluir que, a prática de exercícios anaeróbicos ou aeróbicos regulares e moderados parecem ter impacto positivo no curso da doença, com melhora do perfil inflamatório e da resposta imune, enquanto que exercícios excessivos e de alta intensidade podem ser tão prejudiciais, para portadoras de endometriose, quanto o sedentarismo

Conclusões específicas

- Ocorreu aumento da área dos implantes apenas do início à reabertura, nos grupos que praticaram atividades físicas, após esse período houve regressão. No grupo controle, que não foi submetido ao protocolo de exercícios, houve aumento na da área dos implantes, entre a reabertura e a eutanásia.

- Na análise histológica proposta por Keenan, dezesseis ratas apresentaram escore zero e vinte ratas apresentaram escore maior que zero que caracterizava a presença da endometriose. Na comparação dos grupos em relação às variáveis quantitativas foi usado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e não houve significância estatística.

- As citocinas TNF- α , IL-2 e IL-4 tiveram grandes variações entre a reabertura e a eutanásia, nos grupos que praticaram atividade física anaeróbica e aeróbica e pequenas variações durante o mesmo período, para o grupo que praticou atividade física mista e o controle.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

A continuação desta pesquisa, aumentando o número de citocinas avaliadas em conjunto com outras análises conduzidas com o mesmo material coletado ou a reprodução do projeto de pesquisa em humanas, poderiam trazer informações relevantes para um entendimento mais fundamentado dos impactos das atividades físicas na fisiopatologia da endometriose e sugerir consistentes opções profiláticas e terapêuticas para a prática clínica.

10. REFERÊNCIAS

ABD EL-KADER, S.; GARI, A.; SALAH EL-DEN, A. Impact of moderate versus mild aerobic exercise training on inflammatory cytokines in obese type 2 diabetic patients: a randomized clinical trial. *African Health Sciences*, v.13, n.4, dec, 2013.

AHN, S.H.; MONSANTO, S.P.; MILLER, C.; SINGH, S.S.; THOMAS, R.; TAYADE, C. Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis. *BioMed Research International*, 2015:795976, 2015.

ANDREOLLO, N.A.; SANTOS, E.F.; ARAUJO, M.R.; LOPES, L.R. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? *ABCD, Arq. Bras. Cir. Dig.*, vol.25, n.1, 49-51, 2012.

BEDAIWY, M.A.; FALCONE, T.; SHARMA, R.K.; GOLDBERG, J.M.; ATTARAN, M.; NELSON, D.R.; AGARWAL, A. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers. *Human Reproduction*, v.17, n.2, 426-31, feb, 2002.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. Ativação e função dos linfócitos T e B. *Imunologia*, 4ª ed. Guanabara Koogan, p.11-25. Rio de Janeiro. 2002.

BERKKANOGLU, M.; ARICI, A. Immunology and endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.50, n.1, 48-59, jul, 2003.

BONOCHE, C.M.; MONTENEGRO, M.L.; ROSA E SILVA, J.C.; FERRIANI, R.A.; MEOLA, J. Endometriosis and physical exercises: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.12, n.4, jan, 2014.

BRUUNSGRARD, H. Physical activity modulation of systemic low-level inflammation. *J Leukoc Biol*, v. 46, n. 78, 19-35, oct 2005.

CRAMER, D.W.; WILSON, E.; STILLMAN, R.J.; BERGER, M.J.; BELISLE, S.; SCHIFF, I.; ALBRECHT, B.; GIBSON, M.; STADEL, B.V.; SCHOENBAUM, S.C. The Relation of Endometriosis to Menstrual Characteristics, Smoking, and Exercise. *JAMA*, v. 255, n.14, 1904–1908, 1986.

DO AMARAL, V. F.; DAL LAGO, E. A.; KONDO, W.; SOUZA, L. C. G.; FRANCISCO, J. C. Desenvolvimento de modelo experimental de endometriose em ratas. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, Curitiba, Paraná, v. 36, n. 3, 250–255, 2009.

DHILLON, P.K.; HOLT, V.L. Recreational physical activity and endometrioma risk. *Am J Epidemiol*, v.15, n.158(2), 156-64, jul, 2003.

FARINHA, J.B.; STECKLING, F.M.; STEFANELLO, S.T.; CARDOSO, M.S.; NUNES, L.S.; BARCELOS, R.P.; DUARTE, T.; KRETZMANN, N.A.; MOTA, C.B.; BRESCIANI, G.; MORESCO, R.N.; DUARTE, M.M.; DOS SANTOS, D.L.; SOARES, F.A. Response of oxidative stress and inflammatory biomarkers to a 12-week aerobic exercise training in women with metabolic syndrome. *Sports Medicine – Open*, v.1, 19, apr, 2015.

FEBBRAIO, M.A. Exercise and inflammation. *Journal of Applied Physiology Published*, v.103, n.1, 376-377, jul, 2007.

GARAVAGLIA, E.; RICCI, E.; CHIAFFARINO, F.; CIPRIANI, S.; CIOFFI, R.; VIGANÒ, P.; FRIGERIO, A.; CANDIANI, M.; PARAZZINI, F.; Leisure and occupational physical activity at different ages and risk of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.183, 104-8, dec, 2014.

GHOLAMNEZHAD, Z.; BOSKABADY, M.H.; HOSSEINI, M.; SANKIAN, M.; KHAJAVI, R.A.D.A. Evaluation of immune response after moderate and

overtraining exercise in wistar rat. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, v.17, n.1,1-8, jan, 2014.

GLEESON, M.; BISHOP, N.C.; STENSEL, D.J.; LINDLEY, M.R.; MASTANA, S.S.; NIMMO, M.A. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Reviews Immunology*, v.11, 607-615, sep, 2011.

HAN, M; PAN, L; WU, B; BIAN, X. A case-control epidemiologic study of endometriosis. *Chin Med Sci J*, v. 9, n. 2, 114-8, jun, 1994.

HARADA, T.; IWABE, T.; TERAOKAWA, N. Role of cytokines in endometriosis. *Fertility and Sterility*, v.76, n.1, 1-10, jul, 2001.

HEILIER, J.F.; DONNEZ, J.; NACKERS, F.; ROUSSEAU, R.; VEROUGSTRAETE, V.; ROSENKRANZ, K.; DONNEZ, O.; GRANDJEAN, F.; LISON, D.; TONGLET, R. Environmental and host-associated risk factors in endometriosis and deep endometriotic nodules: a matched case-control study. *Environ Res*, v.103, n.1, 121-9, jan, 2007.

HUGHES, C.L.; FOSTER, W.G.; AGARWAL, S.K. The Impact of Endometriosis across the Lifespan of Women: Foreseeable Research and Therapeutic Prospects. *BioMed Research International*, 2015:158490, jan, 2015.

KEENAN, J. A.; WILLIAMS-BOYCE, P. K.; MASSEY, P. J.; CHEN, T. T.; CAUDLE, M. R.; BUKOVSKY, A. Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with the immune modulators loxoribine and levamisole. *Fertility and Sterility*, San Francisco CA, v.72, n. 1, 135–141, 1999.

KOPPAN, A.; HAMORI, J.; VRANICS, I.; GARAI, J.; KRISZBACHER, I.; BODIS, J.; REBEK-NAGY, G.; KOPPAN, M. Pelvic pain in endometriosis: painkillers or sport to alleviate symptoms? *Acta Physiol Hung*, v. 97, n.2, 234-9, jun, 2010.

KRÁLÍČKOVÁ, M.; VETVICKA, V. Immunological aspects of endometriosis: a review. *Annals of Translational Medicine*, v.3, n.11,153, jun, 2015.

KVASKOFF, M.; BIJON, A.; CLAVEL-CHAPELON, F.; MESRINE, S.; BOUTRON-RUAULT, M.C. Childhood and adolescent exposures and the risk of endometriosis. *Epidemiology*, v. 24, n.2, 261-9, mar, 2013.

KWAK-KIM, J.Y.; GILMAN-SACHS, A.; KIM, C.E. T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. *Chemical Immunology and Allergy*, v.88, 64-79, 2005.

LEE, G.H.; CHOI, Y.M.; KIM, S.H.; HONG, M.A.; OH, S.T.; LIM, Y.T.; MOON, S.Y. Association of tumor necrosis factor- α gene polymorphisms with advanced stage endometriosis. *Human Reproduction*, v.23, n.4, 977-81, feb, 2008.

MALUTAN, A.M.; DRUGAN, T.; COSTIN, N.; CIORTEA, R.; BUCURI, C.; RADA, M.P.; MIHU, D. Pro-inflammatory cytokines for evaluation of inflammatory status in endometriosis. *Central European Journal of Immunology*, v.40, n.1, 96-102, apr, 2015.

MARTÍNEZ, S.; GARRIDO, N.; COPERIAS, J.L.; PARDO, F.; DESCO, J.; GARCÍA-VELASCO, J.A.; SIMÓN, C.; PELLICER, A. Serum interleukin-6 levels are elevated in women with minimal-mild endometriosis. *Human Reproduction*, v.22, n.3, 836-42, mar, 2007.

MAYBINA, J.A.; CRITCHLEYA, H.O.D.; JABBOURB, H.N. Inflammatory pathways in endometrial disorders. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.335, n.1, 42–51, mar, 2011.

MEHEDINTU, C.; PLOTOGEA, M.N.; IONESCU, S.; ANTONOVICI, M. Endometriosis still a challenge. *Journal of Medicine and Life*, v.7, n.3, 349-357, jul, 2014.

MILLER, J.E.; AHN, S.H.; MONSANTO, S.P.; KHALAJ, K.; KOTI, M.; TAYADE, C. Implications of immune dysfunction on endometriosis associated infertility. *Oncotarget*, v. 8, n. 4, 7138-7147, jan, 2017.

MOEN, M.H.; SCHEI, B. Epidemiology of endometriosis in a Norwegian county. *Acta Obstet Gynecol Scand*, v. 76, n.6, 559-62, jul, 1997.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, v.7, 145-73, 1989.

PODGAEC, S.; ABRAO, M.S.; DIAS JR, J.A.; RIZZO, L.V.; R.M.DE OLIVEIRA, R.M.; BARACAT, E.C. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Human Reproduction*, v.22, n.5, 1373–1379, jan 2007.

PODGAEC, S.; DIAS JUNIOR, J.A.; CHAPRON, C.; OLIVEIRA, R.M.; BARACAT, E.C.; ABRÃO, M.S. Th1 and Th2 immune responses related to pelvic endometriosis. *Rev Assoc Med Bras*, v.56, n.1, 92-8, jan-feb 2010.

RIAZI, H.; TEHRANIAN, N.; ZIAEI, S.; MOHAMMADI, E.; HAJIZADEH, E.; MONTAZERI, A. Clinical diagnosis of pelvic endometriosis: a scoping review. *BioMed Central Womens Health*, v.15, 39, may, 2015.

RICCI, E.; VIGANÒ, P.; CIPRIANI, S.; CHIAFFARINO, F.; BIANCHI, S.; REBONATO, G.; PARAZZINI, F. Physical activity and endometriosis risk in women with infertility or pain: Systematic review and meta-analysis. *Medicine*, Baltimore, v.95, 40, oct 2016.

SELI, E.; BERKKANOGLU, M.; ARICI, A. Pathogenesis of endometriosis. *Obstetrics & Gynecology Clinics of North America*, v. 30, n.1, 41-61, mar 2003.

SHINOHARA, A.; KUTSUKAKE, M.; TAKAHASHI, M.; KYO, S.; TACHIKAWA, E.; TAMURA, K. Protease-activated receptor-stimulated interleukin-6 expression in endometriosis-like lesions in an experimental mouse model of endometriosis. *Journal of Pharmacological Sciences*, v.119, n.1, 40-51, apr, 2012.

SIGNORELLO, L.B.; HARLOW, B.L.; CRAMER, D.W.; SPIEGELMAN D.; HILL J.A. Epidemiologic determinants of endometriosis: a hospital-based case-control study. *Ann Epidemiol*, v. 7, n. 4, 267-741, may, 1997.

TIBANA, R.A.; NASCIMENTO, D.D.A. C.; DE SOUSA, N.M.; DE SOUZA, V.C.; DURIGAN, J.; VIEIRA, A.; BOTTARO, M.; NÓBREGA, O.D.E. T.; DE ALMEIDA, J.A.; NAVALTA, J.W.; FRANCO, O.L.; PRESTES, J. Enhancing of women functional status with metabolic syndrome by cardioprotective and anti-inflammatory effects of combined aerobic and resistance training. *PLoS One*. V.7, 9-11, e110160, nov, 2014.

ULUKUS, M.; ARICI, A. Immunology of endometriosis. *Minerva Ginecologica*, v.57, n.3, 237-48, jun, 2005.

VITONIS, A.F.; HANKINSON, S.E.; HORNSTEIN, M.D.; MISSMER, S.A. Adult physical activity and endometriosis risk. *Epidemiology*, v. 21, n.1, 16-23, jan, 2010.

VITONIS, A.F.; MARUTI, S.S.; HANKINSON, S.E.; HORNSTEIN, M.D.; MISSMER, S.A. Adolescent physical activity and endometriosis risk. *J Endometr*, v. 1, n. 1(3-4), 157-163, jul, 2009.

WEISS, G.; GOLDSMITH, L.T.; TAYLOR, R.N.; BELLET, D.; TAYLOR, H.S. Inflammation in reproductive disorders. *Reproductive Sciences*, v.2, 216-29, feb., 2009.

WOODS, J.A.; VIEIRA, V.J.; KEYLOCK, K.T. Exercise, inflammation, and innate immunity. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, v.29, n.2, 381-393, may, 2009.

WU, M.Y.; HO, H.N. The Role of Cytokines in Endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.49, 285–296, 2003.

WU, M.Y.; YANG, J.H.; CHAO, K.H.; HWANG, J.L.; YANG, Y.S.; HO, H.N. Increase in the expression of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, v. 74, n. 6, 1187-91, dec 2000.

ZHAO, G.; ZHOU, S.; DAVIE, A.; SU, Q. Effects of moderate and high intensity exercise on T1/T2 balance. *Exerc Immunol Rev*, v.18, 98-114, 2012.

11. ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Núcleo de Bioética do CEUA PUCPR



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 18 de abril de 2013.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 774 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Comparação da terapêutica entre atividade física aeróbica e anaeróbica nos níveis de inflamação na endometriose experimental em modelo animal

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Vivian Ferreira do Amaral

EQUIPE DE PESQUISA:

Vivian Ferreira Amaral, Ricardo Correa da Cunha, Caroline Peschel A. B Iplinski.

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Medicina / Medicina

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
<i>Ratas Wistar</i>	Fêmea	3 meses / 200g	C	40

O colegiado do CEUA em reunião no dia 18/04/2013, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.



Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

Prof.ª Marta Luciane Fischer
Coordenadora
Comitê de Ética no Uso de Animais



Anexo 2. Pôster apresentado durante o 13th World Congress on Endometriosis em Vancouver-CA, de 17 a 20 de maio de 2017.



UFPR

INFLUENCE OF PHYSICAL ACTIVITY IN INFLAMMATORY CYTOKINES AND IMMUNOLOGICAL SYSTEM IN ANIMAL MODEL OF EXPERIMENTAL ENDOMETRIOSIS



PUCPR
GRUPO MARISTA

V.F. Amaral¹, M.G. Duarte², C.P.A.B. Iplinski³, R. Cunha⁴, L.C. Guarita-Souza^{1,5}, C.A.M. Aita⁶
 1- Professor of Federal University of Paraná Endometriosis Sector, 2- Master degree student, 3- Medical student, 4- Positivo University, 5- Professor of Pontifical Catholic University of Paraná, 6- Researcher
Curitiba/Brazil

OBJECTIVES

This study analyzed the influence of the practice of physical activity on serum levels of inflammatory cytokines and the impact on the immune system of Wistar rats with experimental endometriosis.

RESULTS

For all the groups, we did the Keenan histological classification, at the beginning of physical activity and at euthanasia. **G1** apparently did not present significant differences, but the measurements of the cytokines IL2 and IL4 suggest that this group stimulated immune response mediated by Th1/Th2 cells and reduced TNF-alfa. **G2** did aerobic activity and presented reduction in the mean size of the implant and increase in IL4 that initiated the action of Th2 lymphocytes, which are responsible for positive immune feedback. **G3** which added the modalities and times of physical activities practice, presented a mean increase in the size of the implants and there wasn't difference in measurements of the cytokines, what suggest that this group suppressed the immune response and would be harmful to individuals with endometriosis, whereas **G4** didn't present significant differences between reopening and euthanasia.

METHODS

An experimental study was performed with 40 rats with experimental endometriosis, randomly distributed in 4 groups of 10 animals that practiced anaerobic physical activity (Group1-G1), aerobic physical activity (Group2-G2), combined aerobic and anaerobic physical activity (Group3-G3), control (Group4-G4) for 3 weeks. The size of the implant and interleukins IL2, IL4 and serum TNF-alpha were measured before and after the practice of physical activity.

Surgery and reopening to experimental endometriosis



Physical activity for 21days



Luminex kit and stored blood at -112°F

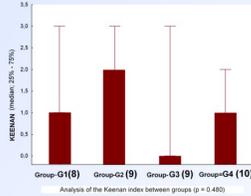
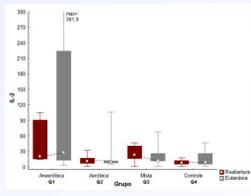
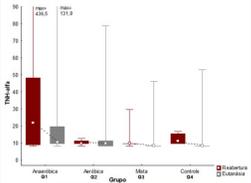
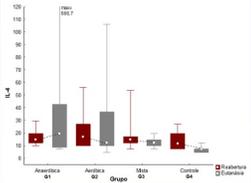


Lab made the plate



Plaque analyzed



CONCLUSION



13th WORLD CONGRESS ON ENDOMETRIOSIS
Turning over a new leaf
WCE2017 VANCOUVER 17-20 MAY 2017

Anexo 3. Artigo

**INFLUENCE OF PHYSICAL ACTIVITY TYPES IN
INFLAMMATORY
CYTOKINES IN ANIMAL MODEL OF EXPERIMENTAL
ENDOMETRIOSIS**

Marcella G. Duarte, MD¹, Caroline P.A.B. Iplinski, MD¹, Julio C. Francisco, PhD²,
Carlos A.M. Aita, MD, PhD⁴, Viviam F. do Amaral, MD, PhD³, Luiz C. Guarita-
Souza, MD, PhD¹

1- *Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Brazil*

2- *Universidade Positivo (UP), Curitiba, Brazil*

3- *Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brazil*

4- *Researcher*

KEY WORDS

Endometriosis; Inflammation; Cytokines; Physical activity.

Corresponding author:

Luiz Cesar Guarita Souza, MD, PhD.

School of Medicine. Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Rua Imaculada Conceição. 1155. Curitiba. PR. 80215-901

Phone/Fax: +55 41 32711657

Email: guaritasouzalc@hotmail.co

ABSTRACT

Endometriosis is a chronic disease, of high prevalence, that until now has no specific treatment protocols or definitive cure. Considering that the practice of physical activity has a beneficial effect and is part of the therapeutic arsenal of chronic inflammatory diseases, we try to observe the possible influences of the practice of physical activity in rats submitted to experimental endometriosis. **OBJECTIVE:** To analyze the influence of physical exercise modes on the serum levels of inflammatory cytokines of rats with experimental endometriosis, in order to evaluate if the practice can help in the treatment of the disease. **METHODS:** The experimental study was performed with 40 rats, randomly assigned to 4 groups of 10 animals. Three groups that practiced physical, anaerobic (G1), aerobic (G2), aerobic and anaerobic combined (G3) and a control group with sedentary rats (G4) for 3 weeks. The size of the endometriosis implants, interleukins IL-2, IL-4 and serum TNF- α were measured before and after physical activity. **RESULTS:** Histological classification of Keenan was performed for all groups at the beginning of physical activity and in euthanasia. In the G1 that apparently did not present significant differences in the macroscopic analysis, the measurements of IL-2, IL-4 and TNF- α cytokines presented significant alterations. The G2, which performed aerobic activity and presented a significant reduction in the mean size of the implants, had an increase in IL-4. In G3, which practiced and summed the times of the two modalities, there was no significant difference in the cytokines. The G4, control, showed a slight increase in the mean size of the implants and did not have significant differences in the cytokines. **CONCLUSION:** The results suggest that the moderate practice of physical activity seems to be beneficial in endometriosis, whereas excessive training may cause changes in the release of cytokines and immune response, which aggravate the disease as a sedentary lifestyle.

INTRODUCTION

The protective effects of regular physical exercise have already been extensively described in the treatment of various cardiovascular, metabolic and osteoarticular inflammatory diseases. Moderate and regular physical activity may increase

systemic levels of cytokines with anti-inflammatory properties and improve immune system responses, but it is not possible to point out the actual role of physical exercise in endometriosis based on current scientific literature. 1,2,3,4,5,6,7,8

Pelvic endometriosis is a chronic inflammatory gynecological condition, dependent on estrogen, prevalent in 10 to 15% of the female population during menarche. It can be defined as the growth of endometrial tissue, gland and / or stroma, in other tissues beyond the uterus, which undergoes the same cyclic histologic change of the uterine endometrium. Pathology difficult to diagnose, has a negative impact on the physical, mental and social health of the women affected. Its repercussions are associated with a wide variety of symptoms such as dysmenorrhea, dyspareunia, pelvic pain and infertility. It was studied in the last years, with the objective of clarifying aspects not yet fully clarified as risk factors, etiology, prevention, treatment, infertility and relapses. 9,10,11

Several studies have described the relationship between cytokines and endometriosis, due to high concentrations in the peritoneal fluid of patients. Cytokines can participate in the development of the disease in different situations such as migration of macrophages into the peritoneal cavity, adhesion of the endometrial cells to the peritoneum, adhesion of the stromal cells to fibronectin, and angiogenesis for maintenance of the implants in the peritoneum. 11

Endometrial epithelial cells secrete cytokines such as IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-8 that participate in immune responses and are T cell regulators, which are generally altered in women with endometriosis. Th1 cells produce IFN- γ , TNF- β and IL-2, which activate macrophages and are responsible for cell-mediated immunity and protection against intracellular pathogens. Th2 cells produce IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 and IL-13, which promote humoral immunity and are responsible for antibody production, inhibition of macrophages and protection against extracellular pathogens. 12,13

To elucidate whether physical exercise is capable of interfering with the development of endometriosis, studies with experimental models are justified by characterizing the course of the disease, besides the possibility of observing type

and intensity of physical exercise with preventive and curative effects.
14,2,4,5,6,15,16,17,18,19

OBJECTIVE

The objective of this study was to observe the impact of exercise practice and its modality, through the evaluation of endometriosis implants and serum levels of inflammatory cytokines in rats submitted to experimental endometriosis before and after a physical activity protocol.

MATERIALS AND METHODS

This experimental study was carried out following the ethical norms and principles of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and with the approval of the Ethics Committee of the Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA - protocol nº 774 - 1st version). The choice of rats as a model occurred due to the low cost, ease of handling, resistance of the animals and support in the scientific literature using murine model, submitted to the surgical technique. 20

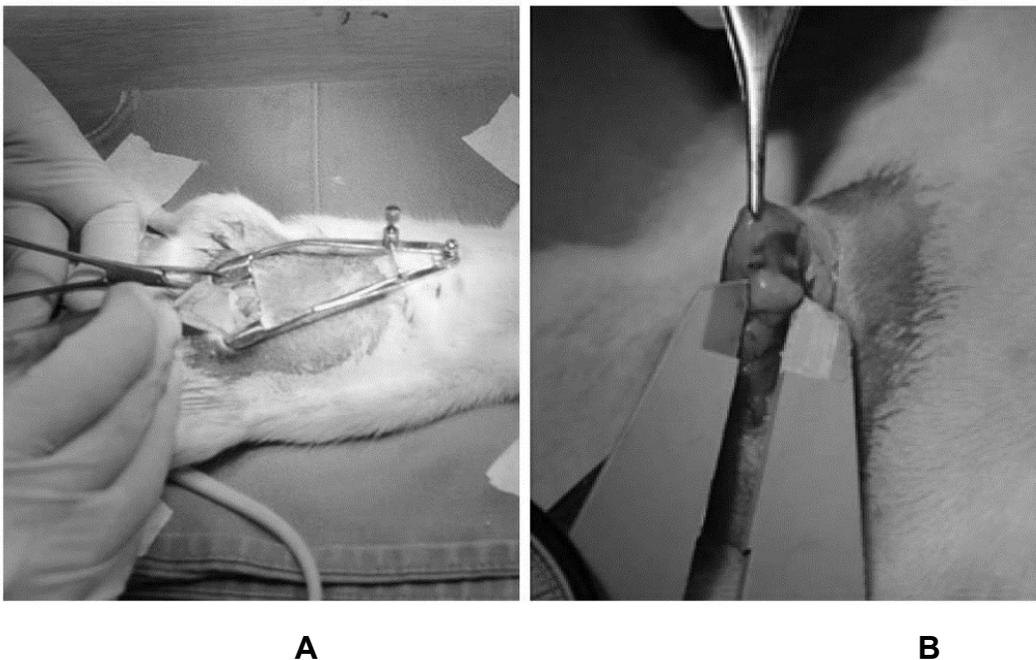


Figure 1. Surgery for induction of endometriosis **(A)**; Reopening surgery and measurement of peritoneal implants **(B)**.

A total of 40 Wistar rats were submitted to surgery to induce endometriosis (Figure 1), which after a procedure to evaluate the implants and them performed a protocol of physical activities randomly distributed in four groups (G1, G2, G3, G4) for a period of 8 weeks. (Figure 2)

Calculation of the training period considered the physiological and biological developmental differences between humans and the chosen animal models, which become sexually mature at about six weeks of age and during adulthood. Several authors have performed experimental studies on rats and stated that there is 30-day correspondence of man for each day of life of the rat, therefore the period of 8 weeks of the rats protocol to which they were submitted, is equivalent to almost 5 years in humans. 21

Considering the deaths occurred during the experiment, n. of each group was: 8 in the G1 group with anaerobic activity, 9 in the G2 group with aerobic activity, 9 in the G3 group with mixed activity and 10 in the G4 control group, which totaled 36 models submitted to euthanasia for tissue collection and analysis.

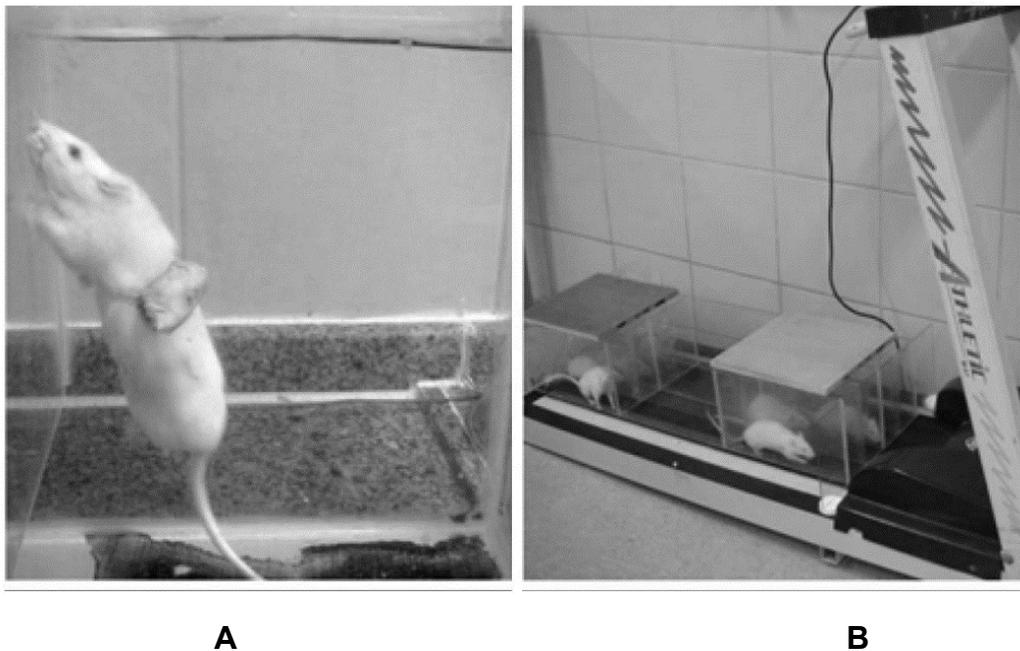


Figure 2. Anaerobic activity (A); Aerobic activity (B).

Cytokines were analyzed by immunofluorescence using the Luminex® Novex kit from Life Thecnologie, Cytokine Magnetic 10-Plex Panel and statistically significant variations were observed in TNF- α , IL-2 and IL-4 levels.

RESULTS

Weight gain

The G1 group, which practiced anaerobic activity, presented the highest average weight gain at the end of the program, which may suggest a greater gain of muscle mass and maintenance of adequate dietary intake. G2 group, who performed aerobic activity, had lower weight gain throughout the study protocol, since it could increase caloric expenditure. The G3 group, which added the anaerobic and aerobic activities, showed weight gain within the standard of all groups. G4 group, the control that underwent experimental endometriosis and remained sedentary, there was no change in weight outside the group average. (Figure 3)

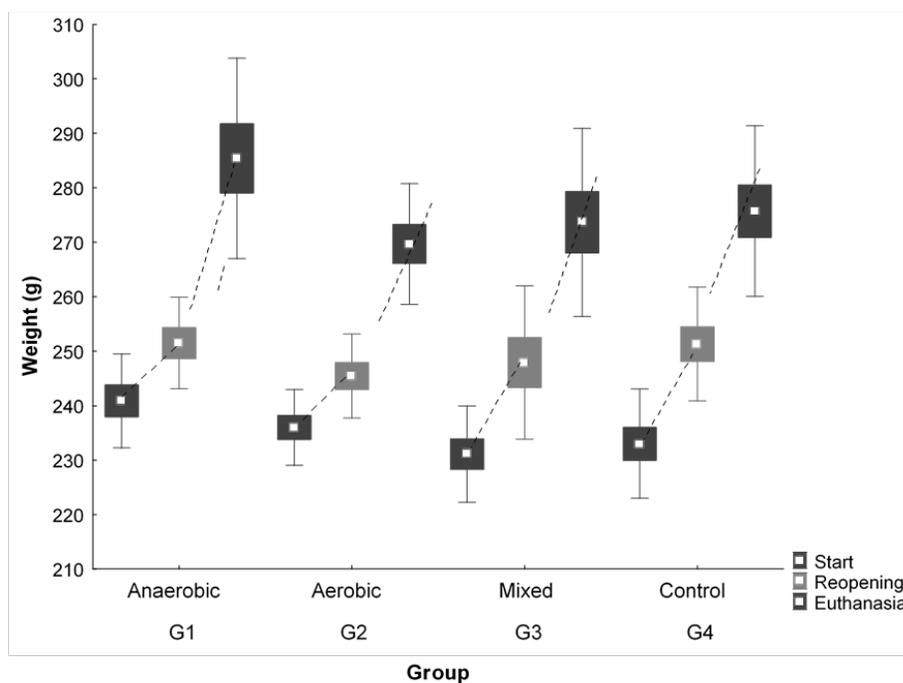


Figure 3. Assessments of weights and differences between evaluations. Descriptive statistics according to groups and values of $p < 0,05$.

Growth of endometriosis implants

Regarding the area of the implants, the main parameter analyzed at beginning of the study, increased only from the beginning to the 21st day, during the development of the disease and after that period there was regression of the area of the implants. Therefore, from the 21 days until euthanasia, there was a reduction in the area of the implants in the groups that practiced physical activities, but in the control group, which was not submitted to the exercise protocol, there was an increase in the average size of the implants. According to the statistical analysis, the group that had the greatest reduction was the one that performed the aerobic activity, but the other groups that performed physical activities also had a decrease of the endometrial implants, in suggestion that the physical activity can reduce the focus of the disease.

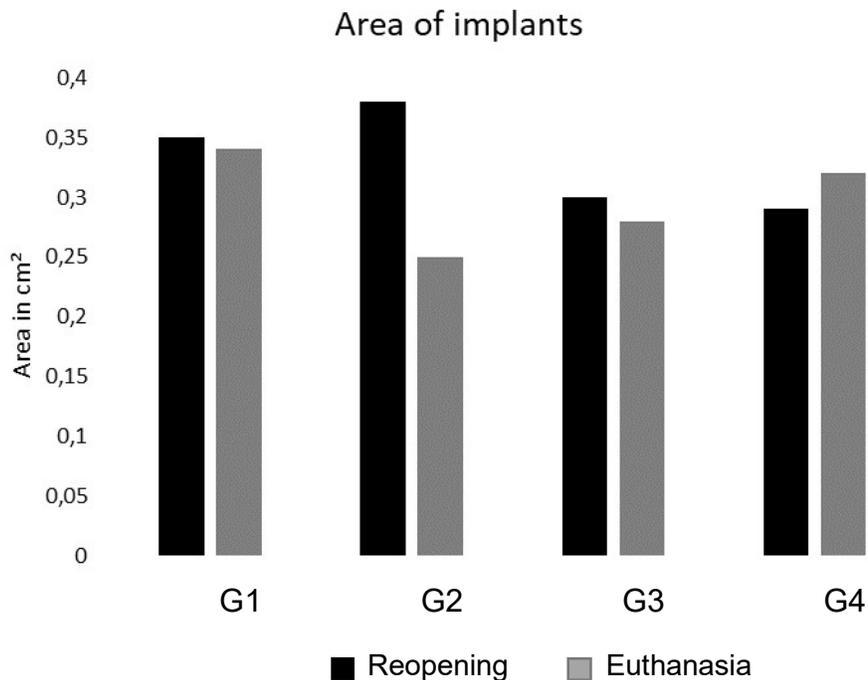


Figure 1. Areas of the implants in each group on reopening and euthanasia.

Wilcoxon non-parametric test, $p < 0.05$

Tumor necrosis factor

In G1, at time of reopening the TNF- α levels were higher than those of the other groups, which suggested a greater inflammatory response and in euthanasia the greater reduction of TNF- α levels was observed, which signaled the impact of anaerobic physical activity on the inflammatory cytokines. The analysis of the cytokines of the G2 group was low or undetectable levels were observed for both TNF- α . Group G3 showed the lowest variations in cytokine levels and the G4 analysis of cytokines, TNF- α levels were slightly increased at reopening, suggestive of inflammatory profile due to the development of the disease and undetectable in euthanasia. (Figure 4) 22

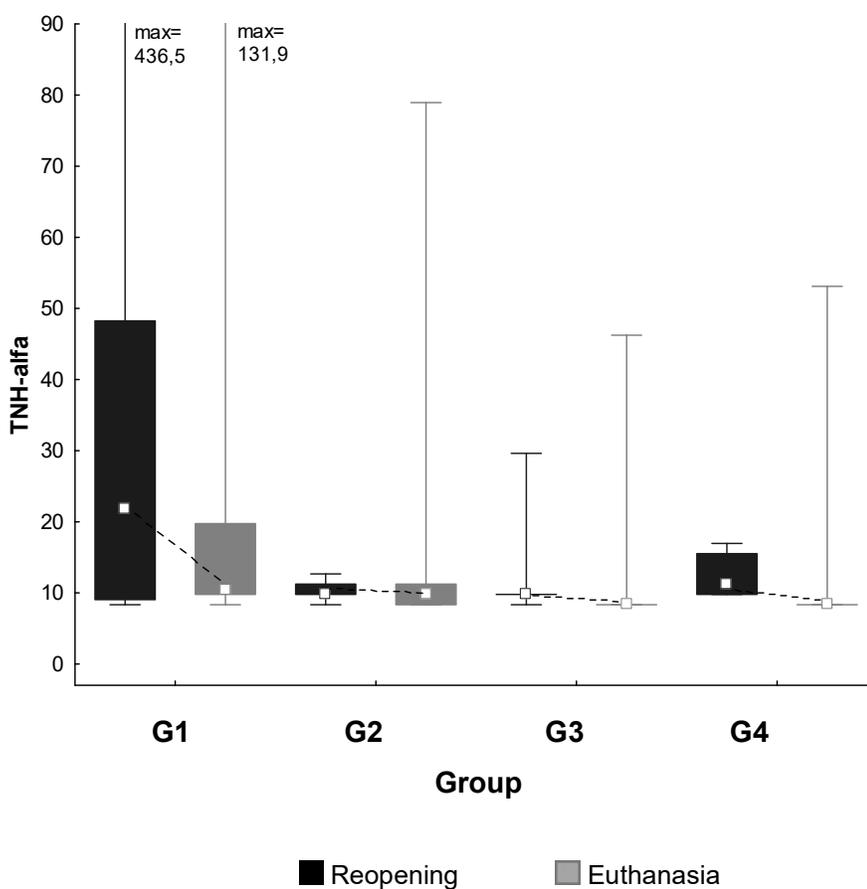


Figure 4. Median TNF- α per group, reopening and euthanasia. Non-parametric Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$

Interleukin-2

As for IL-2, G1 group was the one that also presented the highest levels at the time of reopening, suggestion of inflammatory activity in the development of endometriosis, but unlike TNF- α , IL-2 levels showed a great increase in euthanasia, probably due to the cellular immune response. For G2 the IL-2 both in reopening and euthanasia, was suggestive of low inflammatory activity. In G3, except for a slight increase in IL-2 levels in the reopening samples, the analysis of the cytokines had low or undetectable levels, suggestive of low inflammatory activity. The control G4 presented IL-2 levels that were very low at reopening showed a small increase in euthanasia. (Figure 5) 23

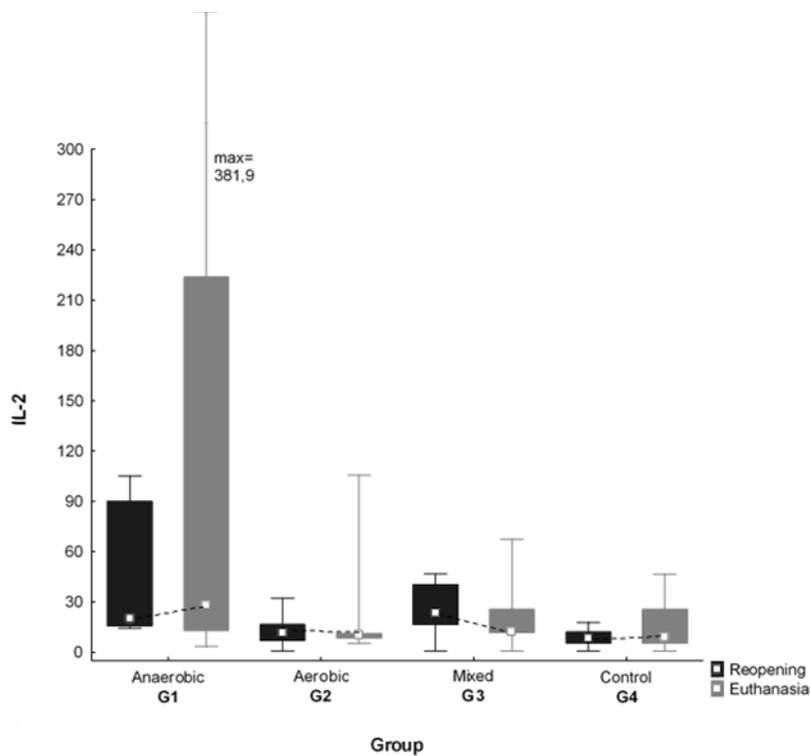


Figure 5. Mean of IL-2 per group at reopening and euthanasia. Kruskal-Wallis non-parametric test, $p < 0.05$.

Table 1. Comparisons between the p-values of the groups for IL-2.

Compared groups	Value of p*
G1- Anaerobic and G2- Aerobic	0,024
G1- Anaerobic and G3- Mixed	0,683
G1- Anaerobic and G4- Control	0,002
G2- Aerobic and G3- Mixed	0,044
G2- Aerobic and G4- Control	0,280
G3- Mixed e G4- Control	0,003

For the evaluation at reopening, a significant difference was found between the groups in relation to IL-2.

Interleukin-4

Group G1 IL-4, at reopening, showed similar levels to other groups, but at the time of euthanasia, the indices were significantly increased, demonstrating the anti-inflammatory activity mediated by physical activity. In G2 IL-4 levels were increased at reopening and still increased at euthanasia, indicative of the activation of the humoral immune system to combat ectopic cells. The G3 analysis of the cytokines had low or undetectable levels, suggestive of low inflammatory activity or low immune response. At G4 group the IL-4 levels that were slightly increased at reopening, at euthanasia were well reduced. (Figure 6) 23,24

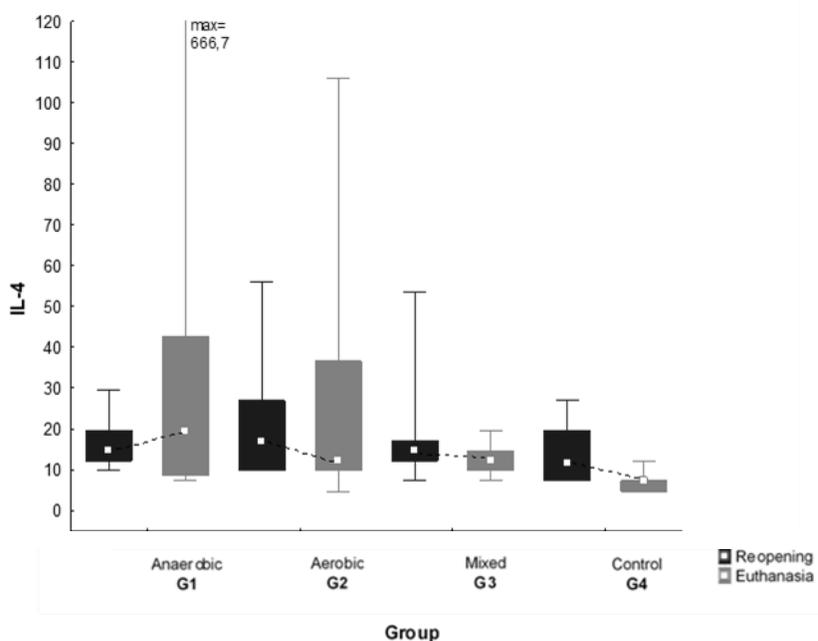


Figure 6. Mean of IL-4 per group at reopening and euthanasia. Kruskal-Wallis non-parametric test, $p < 0.05$.

Table 2. Comparisons between the p-values of the groups for IL-4.

Groups compared	Value of p*
G1- Anaerobic e G2- Aerobic	0,543
G1- Anaerobic e G3- Mixed	0,410
G1- Anaerobic e G4- Control	0,002
G2- Aerobica e G3- Mixed	0,822
G2- Aerobica e G4- Control	0,008
G3- Mixed e G4- Control	0,014

For euthanasia evaluation, a significant difference was found between the groups in relation to the IL-4 found. Thus, the groups were compared two by two.

Group 1 (G1), which practiced anaerobic activity, presented the highest mean weight gain at the end of the program. Regarding the growth of endometriosis implants, the group presented a slight reduction, when compared to measures on reopening and euthanasia. This group presented the most significant changes in cytokine, TNF- α , IL-2 and IL-4 indices, both in reopening and in euthanasia. At the time of reopening the TNF- α levels were higher than in the other groups and in euthanasia the highest reduction in TNF- α levels was observed. As for IL-2, group 1 was the one that also presented the highest levels at the time of reopening, but unlike TNF- α , IL-2 levels showed a great increase in euthanasia. Group 1 IL-4, at reopening, showed levels like those in other groups, but at the time of euthanasia, the rates were significantly increased.

Group 2 (G2), who performed aerobic activity, had lower weight gain throughout the study protocol. As to the size of the implants was the group in which there was the greatest reduction. In the analysis of the cytokines of the group, low or undetectable levels were observed for both TNF- α and IL-2 in both reopening and euthanasia. IL-4 levels were increased at reopening and still increased in euthanasia.

Group 3 (G3), which added anaerobic and aerobic activities, presented weight gain within the standard of all groups. In the laboratory method, except for a slight increase in IL-2 levels in the reopening samples, group 3 showed the lowest variations in cytokine levels.

Group 4 (G4), the control, which underwent experimental endometriosis and remained sedentary, did not show any variation in weights outside the group mean and was the only one in which an increase in the euthanasia implants were observed when compared to the reopening. In cytokine analysis, TNF- α levels were slightly increased at reopening. IL-2 levels that were very low at reopening were small in euthanasia, and IL-4 levels that were slightly increased at reopening, euthanasia were well reduced.

DISCUSSION

The treatments available for endometriosis are not yet definitive and may have serious side effects associated with it. This study investigated whether physical activity has some action on the biochemical and histophysiological changes resulting from the response to those of inflammatory cytokines to find new prophylactic and therapeutic possibilities. 12

The practice of regular physical activity can contribute both as a therapeutic tool supporting and preventively for the development of diseases, particularly those related to chronic inflammatory processes. For endometriosis, there is no consensus on the impact of physical activity on physical activity, although it is a pathology involving inflammation. Nor are there any references as to the type and intensity of exercises that could act in the affected women and these were the issues that motivated the design of this research project. 1,14

The present study found that in rats that practiced anaerobic physical activity, there was a significantly higher serum level of TNF- α and IL-2 compared to the other groups, both reopening and euthanasia. It also observed higher levels of IL-4 activity in the anaerobic and aerobic physical activity groups in the blood samples

collected at both times, which indicated higher immune response activity than in the mixed and control groups. 24,25

In the available literature it is not possible to indicate if there is and what the real impact of physical activity on endometriosis, so the studies with experimental models are justified to try to demonstrate the role of the exercises on the prevention and treatment of the disease, because they seem to allow the characterization of time and course of the same. In this type of project, in addition to elucidating whether physical activity is capable of interfering in the development of the disease, it is possible to determine the type of activity and intensity necessary for the physical exercise to be used in a beneficial way. 1,14

CONCLUSION

With this study it is possible to conclude that physical activity has an impact on the development and maintenance of ectopic endometrial implants. That the practice of regular and moderate anaerobic or aerobic exercises seems to have a positive impact on the course of the disease, with an improvement in the inflammatory profile, while excessive exercise can aggravate the disease as well a sedentary lifestyle.

REFERENCES

1. BONOCHER, C.M.; MONTENEGRO, M.L.; ROSA E SILVA, J.C.; FERRIANI, R.A.; MEOLA, J. Endometriosis and physical exercises: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.12, n.4, jan, 2014.
2. CRAMER, D.W.; WILSON, E.; STILLMAN, R.J.; BERGER, M.J.; BELISLE, S.; SCHIFF, I.; ALBRECHT, B.; GIBSON, M.; STADEL, B.V.; SCHOENBAUM, S.C. The Relation of Endometriosis to Menstrual Characteristics, Smoking, and Exercise. *JAMA*, v. 255, n.14, 1904–1908, 1986.
3. HAN, M; PAN, L; WU, B; BIAN, X. A case-control epidemiologic study of endometriosis. *Chin Med Sci J*, v. 9, n. 2, 114-8, jun, 1994.

4. SIGNORELLO, L.B.; HARLOW, B.L.; CRAMER, D.W.; SPIEGELMAN D.; HILL J.A. Epidemiologic determinants of endometriosis: a hospital-based case-control study. *Ann Epidemiol*, v. 7, n. 4, 267-741, may, 1997.
5. DHILLON, P.K.; HOLT, V.L. Recreational physical activity and endometrioma risk. *Am J Epidemiol*, v.15, n.158(2), 156-64, jul, 2003.
6. VITONIS, A.F.; HANKINSON, S.E.; HORNSTEIN, M.D.; MISSMER, S.A. Adult physical activity and endometriosis risk. *Epidemiology*, v. 21, n.1, 16-23, jan, 2010.
7. KOPPAN, A.; HAMORI, J.; VRANICS, I.; GARAI, J.; KRISZBACHER, I.; BODIS, J.; REBEK-NAGY, G.; KOPPAN, M. Pelvic pain in endometriosis: painkillers or sport to alleviate symptoms? *Acta Physiol Hung*, v. 97, n.2, 234-9, jun, 2010.
8. MEHEDINTU, C.; PLOTOGEA, M.N.; IONESCU, S.; ANTONOVICI, M. Endometriosis still a challenge. *Journal of Medicine and Life*, v.7, n.3, 349-357, jul, 2014.
9. SELI, E.; BERKKANOGLU, M.; ARICI, A. Pathogenesis of endometriosis. *Obstetrics & Gynecology Clinics of North America*, v. 30, n.1, 41-61, mar 2003.
10. RIAZI, H.; TEHRANIAN, N.; ZIAEI, S.; MOHAMMADI, E.; HAJIZADEH, E.; MONTAZERI, A. Clinical diagnosis of pelvic endometriosis: a scoping review. *BioMed Central Womens Health*, v.15, 39, may, 2015.
11. HARADA, T.; IWABE, T.; TERAOKAWA, N. Role of cytokines in endometriosis. *Fertility and Sterility*, v.76, n.1, 1-10, jul, 2001.
12. PODGAEC, S.; ABRAO, M.S.; DIAS JR, J.A.; RIZZO, L.V.; R.M.DE OLIVEIRA, R.M.; BARACAT, E.C. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Human Reproduction*, v.22, n.5, 1373–1379, jan 2007.
13. MAYBINA, J.A.; CRITCHLEYA, H.O.D.; JABBOURB, H.N. Inflammatory pathways in endometrial disorders. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.335, n.1, 42–51, mar, 2011.

14. RICCI, E.; VIGANÒ, P.; CIPRIANI, S.; CHIAFFARINO, F.; BIANCHI, S.; REBONATO, G.; PARAZZINI, F. Physical activity and endometriosis risk in women with infertility or pain: Systematic review and meta-analysis. *Medicine*, Baltimore, v.95, 40, oct 2016.
15. GARAVAGLIA, E.; RICCI, E.; CHIAFFARINO, F.; CIPRIANI, S.; CIOFFI, R.; VIGANÒ, P.; FRIGERIO, A.; CANDIANI, M.; PARAZZINI, F.; Leisure and occupational physical activity at different ages and risk of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.183, 104-8, dec, 2014.
16. HEILIER, J.F.; DONNEZ, J.; NACKERS, F.; ROUSSEAU, R.; VEROUGSTRAETE, V.; ROSENKRANZ, K.; DONNEZ, O.; GRANDJEAN, F.; LISON, D.; TONGLET, R. Environmental and host-associated risk factors in endometriosis and deep endometriotic nodules: a matched case-control study. *Environ Res*, v.103, n.1, 121-9, jan, 2007.
17. KVASKOFF, M.; BIJON, A.; CLAVEL-CHAPELON, F.; MESRINE, S.; BOUTRON-RUAULT, M.C. Childhood and adolescent exposures and the risk of endometriosis. *Epidemiology*, v. 24, n.2, 261-9, mar, 2013.
18. MOEN, M.H.; SCHEI, B. Epidemiology of endometriosis in a Norwegian county. *Acta Obstet Gynecol Scand*, v. 76, n.6, 559-62, jul, 1997.
19. VITONIS, A.F.; MARUTI, S.S.; HANKINSON, S.E.; HORNSTEIN, M.D.; MISSMER, S.A. Adolescent physical activity and endometriosis risk. *J Endometr*, v. 1, n. 1(3-4), 157-163, jul, 2009.
20. DO AMARAL, V. F.; DAL LAGO, E. A.; KONDO, W.; SOUZA, L. C. G.; FRANCISCO, J. C. Desenvolvimento de modelo experimental de endometriose em ratas. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, Curitiba, Paraná, v. 36, n. 3, 250–255, 2009.
21. ANDREOLLO, N.A.; SANTOS, E.F.; ARAUJO, M.R.; LOPES, L.R. Age of rats versus human age: what is the relationship? *ABCD, Arq. Bras. Cir. Dig.*, Vol.25, n.1, 49-51, 2012.
22. MALUTAN, A.M.; DRUGAN, T.; COSTIN, N.; CIORTEA, R.; BUCURI, C.; RADA, M.P.; MIHU, D. Pro-inflammatory cytokines for evaluation of

- inflammatory status in endometriosis. *Central European Journal of Immunology*, v.40, n.1, 96-102, apr, 2015.
- 23.MAYBINA, J.A.; CRITCHLEYA, H.O.D.; JABBOURB, H.N. Inflammatory pathways in endometrial disorders. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.335, n.1, 42–51, mar, 2011.
- 24.WU, M.Y.; HO, H.N. The Role of Cytokines in Endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.49, 285–296, 2003.
- 25.ULUKUS, M.; ARICI, A. Immunology of endometriosis. *Minerva Ginecologica*, v.57, n.3, 237-48, jun, 2005.