

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JAQUELINE PEDROSO DE ABREU

**O EFEITO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS NA ENDOMETRIOSE
RETROCERVICAL EM MODELO ANIMAL**

CURITIBA

2014

JAQUELINE PEDROSO DE ABREU

**O EFEITO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS NA ENDOMETRIOSE
RETROCERVICAL EM MODELO ANIMAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vivian Ferreira do Amaral

CURITIBA

2014

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

A162e
2014 Abreu, Jaqueline Pedroso de
O efeito das células mesenquimais na endometriose retrocervical em modelo animal / Jaqueline Pedroso de Abreu; orientadora, Vivian Ferreira do Amaral. – 2014
48 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2014.
Bibliografia: p. 43-47

1. Endometriose – Tratamento. 2. Fisiopatologia. 3. Fecundidade humana.
4. Células-tronco mesenquimais - Pesquisa. I. Amaral, Vivian Ferreira do. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 618.1075



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - *Stricto Sensu*

PUCPR
GRUPO MARISTA

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 oito dias do mês de dezembro de 2014, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação, **“O EFEITO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS NA ENDOMETRIOSE RETROCERVICAL EM MODELO ANIMAL”** apresentada por **JAQUELINE PEDROSO DE ABREU** 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
Profa. Dra. Vivian Ferreira do Amaral (PUCPR) Presidente	
Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki (PUCPR)	
Prof. Dr. João Sabino L. da Cunha Filho (UFRGS)	
Profa. Dra. Carmen Lúcia K. Rebelatto (PUCPR)	

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

Profa. Dra. Vivian Ferreira do Amaral (PUCPR) Conceito: A
Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki (PUCPR) Conceito: A
Prof. Dr. João Sabino L. da Cunha Filho (UFRGS) Conceito: A
Profa. Dra. Carmen Lúcia k. Rebelatto (PUCPR) Conceito: A

Parecer Final: _____

Observações da Banca Examinadora:

Profa. Dra. Vivian Ferreira do Amaral
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Flavio Silva Pecoits Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

Dedico este trabalho a meu pai, homem eterno e sempre presente. Meu melhor amigo e companheiro de todas as horas. Meu mestre verdadeiro, meu escudo. A ele, juntamente à minha mãe, dedicarei tudo na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde, força e motivação para manter-me nos estudos.

Agradeço aos meus pais (João e Sueli), meus mestres verdadeiros, os grandes responsáveis pela minha profissão, pelos meus estudos e por tudo que sou.

Agradeço aos meus irmãos (Marcelo, Simone e Eliane), que sempre estiveram comigo, me motivaram e me auxiliaram diretamente na pesquisa.

Agradeço à minha prima Vivianne que muito colaborou durante essa caminhada e aos meus demais familiares que indiretamente me deram forças.

Agradeço aos amigos pelo entusiasmo que muito me ajudou.

Agradeço ao meu esposo Jefferson que me conheceu durante a fase de total dedicação à pesquisa, mas mesmo assim teve amor o suficiente para permanecer ao meu lado.

Agradeço à professora doutora Vivian Ferreira do Amaral, minha orientadora, por transmitir seus conhecimentos e me instigar a refletir sobre a verdadeira missão da pesquisa: o prazer de descobrir.

Agradeço às pessoas que fizeram parte da equipe de pesquisa: Carolina Antunes Savari, graduanda de Medicina, que participou ativamente da pesquisa; professora doutora Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto, que muito me auxiliou com suas explicações sobre o “mundo” das células mesenquimais; professor Luiz Guilherme Achcar Capriglione, que foi primordial na extração da medula óssea dos animais; mestrandia Lye Miyague que dispôs do seu tempo para me auxiliar na realização das ecografias das coelhas; professora doutora Lúcia de Noronha que contribuiu com a parte histológica da pesquisa e aos técnicos do Laboratório de Técnica Operatória (Misael e Álvaro) que foram de muito valia na concretização deste trabalho.

Agradeço por fim aos animais de pesquisa, pedras fundamentais neste estudo.

RESUMO

A endometriose é uma moléstia crônica caracterizada pela presença de tecido endometrial ectópico (fora do seu local de origem). Essa moléstia é frequente e atinge de 5 a 15% das mulheres em idade reprodutiva e a sua forma profunda pode acometer até 20% das suas portadoras. Entre suas principais manifestações clínicas estão a dismenorréia, a dispareunia e a infertilidade. Apesar da sua grande morbidade, a patogenia da endometriose ainda não é de todo esclarecida. Atualmente, grupos de pesquisa tentam achar uma ligação de células-tronco, principalmente da linhagem mesenquimal, na origem da doença. Já se tem estudos demonstrando a presença de células-tronco nos endométrios humano e animal; da mesma forma que linhas de pesquisa tentam evidenciar que a transição epitélio-mesenquimal, ocorrendo no endométrio humano, tenha participação na fisiopatologia da endometriose. No presente trabalho, nos propusermos a observar o efeito da aplicação de células mesenquimais em implantes de endometriose retrocervical (forma profunda), criados a partir de um fragmento do próprio útero, em coelhas. Para tal, foram utilizadas 27 coelhas Nova Zelândia as quais foram divididas em três grupos: o grupo Endometriose, em que foi realizado o implante retrocervical de endométrio, o grupo Mesenquimal, em que além da criação da doença foram aplicadas células mesenquimais e o grupo Controle, criado para retirar o viés de manipulação do útero dos animais. Foram analisadas a taxa de fertilidade, o tempo de início do período fértil, os resultados obstétricos, a diferença no tamanho dos implantes, a histologia dos mesmos e o inventário da pelve. Obtivemos como taxa de fertilidade os seguintes valores: 77,78% tanto para o grupo Controle quanto para o grupo Endometriose ($p=1$) e 11,20% para o grupo Mesenquimal ($p= 0,015$). Com relação ao tempo para iniciar o período fértil, o grupo Mesenquimal foi o que mais apresentou atraso, com média de $38,8\pm 5$ dias, sendo que o grupo Controle teve média de $29\pm 8,9$ dias e o Endometriose de $20,4\pm 12,7$ dias ($p= 0,005$). Analisando os desfechos obstétricos, obtivemos que o grupo Controle apresentou, das sete gestações, dois óbitos fetais (28,57%), três abortos (42,86%) e dois nascidos vivos (28,57%); já o grupo Endometriose teve dois óbitos fetais (28,57%) e cinco nascidos vivos (71,43%). O grupo Mesenquimal teve uma baixa taxa de fertilidade e careceu de maiores análises. A diferença dos tamanhos dos implantes (final – inicial) foi analisada nos grupos em que os implantes foram criados: Endometriose e Mesenquimal e não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,83$). Com relação ao aspecto macroscópico das lesões, o grupo Mesenquimal foi o que apresentou maiores aderências pélvicas. Para a análise da histologia dos implantes, foi utilizado a Classificação de Keenan. Os dois grupos (Endometriose e Mesenquimal) tiveram uma mediana de 3 no escore e portanto não foi observada diferença significativa ($p=0,730$). Concluímos que o uso de células mesenquimais nos implantes de endometriose das coelhas contribuiu negativamente nas taxas de fertilidade e atrasou o início do período fértil e aumentou o desenvolvimento de aderências pélvicas.

Palavras-chaves: endometriose, coelhas, células mesenquimais.

ABSTRACT

Endometriosis is a chronic disease characterized by the presence of ectopic endometrial tissue (outside the uterine cavity). This disease is common and affects 5-15% of women of reproductive age. Endometriosis in a deeply manner can affect up to 20% of their carriers. Among its main clinical manifestations are dysmenorrhea, dyspareunia, and infertility. The deeply disease is the most way related with infertility. Despite its high morbidity, the pathogenesis of endometriosis is still not entirely clear. Currently, research groups try to find a link of stem cells, especially mesenchymal lineage at the origin of the disease. Studies have already demonstrated the presence of stem cells in animal and human endometrium; the same way as lines of research attempt to prove that the epithelial-mesenchymal transition, occurring in the human endometrium ownership interest in the pathophysiology of endometriosis. In this paper, we propose to observe the effect of mesenchymal cells in implants of endometriosis retrocervical (deeply disease), created from a fragment of the uterus itself, in rabbits. To this, 27 New Zealand rabbits which were divided in three groups were used: the Endometriosis group, where the implant retrocervical of endometriosis was performed, the Mesenchymal group, that in addition to the creation of disease, mesenchymal cells were applied and the Control group, created to remove the bias manipulation of the uterus of animals. Were analyzed the fertility rate, the time taken to enter the fertile period, obstetric outcomes, the difference in the size of implants, the histology of the same and the inventory and pelvis. We obtained as fertility rate the following values: 77.78% for both the Control group and for the Endometriosis group ($p=1$) and 11.20% for mesenchymal group ($p = 0.015$). Regarding the time to start the fertile period, the Mesenchymal group was what else was late, averaging 38.8 ± 5 days, while the Control group had a mean of 29 ± 8.9 days and the Endometriosis group $20, 4 \pm 12.7$ days ($p = 0.005$). Analyzing the obstetric outcomes, we found that the control group showed the seven pregnancies, two fetal deaths (28.57%), three miscarriages (42.86%) and two live births (28.57%); Endometriosis group already had two fetal deaths (28.57%) and five live births (71.43%). The difference in the sizes of implants (final - initial) was analyzed in the groups where the implants were created: Endometriosis and Mesenchymal and there was no statistical difference ($p = 0.83$). About the macroscopic appearance of the lesions, Mesenchymal group showed the greatest pelvic adhesions. To analyze the histology of the implants, the index Keenan, analyzing semi-quantitatively the presence of epithelial cells in implants created, was used (score 3: epithelium preserved till score 0: absence of epithelial.) The two groups (Endometriosis and Mesenchymal) had a median score of 3 and therefore no statistical difference ($p = 0.730$) was observed. We conclude that applying mesenchymal cells in endometriosis implants of rabbits we harmed the fertility rate, we delay the entry in the fertile period and create more pelvic adhesions.

Keywords: endometriosis, rabbits, mesenchymal cells.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Grupo C	Grupo Controle
Grupo E	Grupo Endometriose
Grupo M	Grupo Mesenquimal
PUC PR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
USA	United States of America

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	EPIDEMIOLOGIA	1
1.2	DISTRIBUIÇÃO ANATÔMICA.....	1
1.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	2
1.4	FISIOPATOLOGIA	2
1.5	DIAGNÓSTICO.....	3
1.6	TRATAMENTO	4
1.7	DESCOBERTAS.....	5
1.8	CÉLULAS MESENQUIMAIS	6
1.9	CÉLULAS MESENQUIMAIS ENDOMETRIOSE	8
1.10	MODELOS EXPERIMENTAIS DE ENDOMETRIOSE.....	10
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVO GERAL.....	11
2.2	OBJETIVO SECUNDÁRIO	11
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1	GRUPO ENDOMETRIOSE.....	13
3.1.1	Procedimento cirúrgico.....	13
3.1.2	Pós- operatório e fertilidade.....	15
3.1.3	Diagnóstico de gestação e nascimentos.....	15
3.1.4	Verificação dos implantes.....,	16
3.2	GRUPO CONTROLE.....	17
3.2.1	Procedimento cirúrgico.....	17
3.2.2	Pós-operatório e fertilidade.....	17
3.2.3	Diagnóstico de gestação e nascimentos.....	18
3.2.4	Eutanásia.....	18
3.3	GRUPO MESENQUIMAL.....	18
3.3.1	Procedimento cirúrgico.....	18
3.3.2	Extração e cultivo das células mesenquimais.....	18
3.3.3	Aplicação das células mesenquimais.....	21
3.3.4	Pós-operatório e fertilidade.....	21
3.3.5	Diagnóstico de gestação e nascimento.....	21
3.3.6	Verificação dos implantes.....	22

3.4	FLUXOGRAMA DO DESENHO DA PESQUISA.....	23
3.5	FLUXOGRAMA DOS EVENTOS OCORRIDOS.....	23
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
4	RESULTADOS.....	25
4.1	TAXA DE FERTILIDADE.....	25
4.2	TEMPO PARA INICIAR O PERÍODO FERTIL.....	25
4.3	DESFECHOS OBSTETRICOS.....	27
4.4	COMPARAÇÃO DOS TAMANHOS DOS IMPLANTES.....	28
4.5	COMPARAÇÃO MACROSCÓPICAS NAS REOPERAÇÕES.....	29
4.6	COMPARAÇÃO HISTOLÓGICA DOS IMPLANTES.....	30
5	DISCUSSÃO.....	32
6	CONCLUSÃO	41
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXO – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.	48

1 INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença ginecológica benigna e crônica, caracterizada pela presença de glândulas e/ou estroma endometrial fora da cavidade uterina. A distribuição deste endométrio ectópico é mais frequente no peritônio pélvico, mas pode ocorrer em qualquer víscera ou órgão sistêmico (OLIVEIRA *et al*, 2010).

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Esta moléstia tem uma prevalência entre as mulheres em idade fértil de 5 a 15 % (BELLELIS *et al*, 2011) que prejudica fortemente a qualidade de vida de suas portadoras, acarretando dor e/ou infertilidade (ANDRADE *et al*, 2010). E, apesar de todos os avanços, ainda se apresentam imprecisas a sua etiologia, a sua fisiopatologia e a sua história natural (KAMERGORODSKY *et al*, 2007).

1.2 DISTRIBUIÇÃO ANATÔMICA

A doença pode ser dividida, em nível macroscópico, em três entidades clinicamente distintas: endometriose peritoneal superficial, endometriose ovariana cística (endometrioma) e endometriose infiltrante profunda (NISOLLE e DONNEZ, 1997).

Considera-se doença profunda quando sua infiltração ultrapassa 5 mm de profundidade, diferenciando assim da doença superficial, sendo composta essencialmente por células musculares, epitélio glandular ativo, estroma escasso, com reação inflamatória, retração e fibrose nos tecidos circunjacentes (PODGAEC e ABRÃO, 2004). A doença profunda envolve em ordem crescente de frequência: os ligamentos úterosacros, o septo vaginal, o cólon descendente, a vagina e a bexiga (CHAPRON *et al*, 2006).

A exata incidência de endometriose profunda infiltrativa, na população geral, não é conhecida, mas se estima que deve afetar cerca de 20% do total de mulheres portadoras de endometriose (CHAPRON *et al* 1999). Já na série de Martin *et al* (1985), foi observado que 33% de todas as mulheres submetidas a um procedimento cirúrgico para a endometriose tinham a doença profunda (MARTIN *et al*, 1985).

A grande importância da doença em sua forma profunda, é que esta tem uma correlação maior com a infertilidade (COUTINHO *et al*, 2008; CARNEIRO *et al*, 2013; STRATTON, 2014).

A doença localizada no septo retovaginal, propriamente dito, não é comum (PODGAEC e ABRÃO, 2004), sendo que essa forma de doença é aquela que acomete o tecido conjuntivo existente entre a vagina e o reto, usualmente presente a partir do terço médio da vagina para baixo, diferindo da doença profunda mais alta, posterior ao colo uterino, à qual se denominou endometriose retrocervical (MARTIN e BATT 2001), definindo assim uma forma específica de acometimento.

1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Dentro de suas manifestações, há uma variedade de sintomas dolorosos que podem estar relacionados à aparência, ao grau de invasão, à localização e à profundidade de acometimento das lesões (ABRÃO *et al*, 2003).

No entanto, se por um lado, é dito que não é possível demonstrar relação entre a prevalência e a severidade dos sintomas com o estágio ou sítio das lesões de endometriose (ABRÃO *et al*, 2003), por outro lado, a doença profunda é uma entidade clínica específica responsável por sintomas de dor a qual é relacionada com a localização anatômica da lesão (FANCCONIER e CHAPRON, 2005).

São seis os sintomas que devem ser investigados: dismenorréia, dispareunia, dor pélvica acíclica, infertilidade e alterações urinárias e intestinais cíclicas (PODGAEC e ABRÃO, 2004).

Com relação à infertilidade em específico, 20 a 50% das mulheres submetidas à investigação para tal, descobrem ter endometriose (ESKENAZI e WARNER 1997; ROSA E SILVA e NOGUEIRA, 2004).

1.4 FISOPATOLOGIA

Existem várias teorias que tentam fornecer uma explicação para a fisiopatologia da endometriose. Juntamente com a teoria de Sampson sobre a menstruação retrógrada (SAMPSON, 1921) vários outros pesquisadores tentaram introduzir teorias para justificar a presença de implantes de endometriose em locais

em que o fluxo menstrual não atua como transportador de fragmentos endometriais (ABRÃO *et al*, 2007b).

Entre essas outras teorias, estão a da disseminação linfática e hematogênica (HALBAN 1924 apud KONDO *et al*, 2011), a dos restos embrionários (RECKLINGHAUSEN, 1896 e RUSSEL1899 apud KONDO *et al*, 2011), a da metaplasia celômica (METZGER e HANEY, 1989 apud KONDO *et al*, 2011), a da teoria hormonal e imunológica e a hipótese iatrogênica, entre outras (IHLENFELD *et al*, 2005).

A partir de 1980, o sistema imunológico foi envolvido como facilitador ao implante ectópico de tecido endometrial (ABRÃO *et al*, 2007b). As células envolvidas são linfócitos B e T, granulócitos, monócitos, macrófagos e células natural killers. Os fatores solúveis incluem fator de necrose tumoral, interleucinas 1, 6 e 8, frações do complemento, proteínas inflamatórias de fase aguda e imunoglobulinas (IHLENFELD *et al* e 2005; BELLELIS *et al*, 2011). O que gera controvérsia é se estas alterações precedem a endometriose ou são oriundas dela (ABRÃO *et al*, 2007b). Evidências já têm mostrado que os mediadores do sistema imune, tais como citocinas e quimiocinas, têm papel chave na patogênese da endometriose (LEBOVIC *et al*, 2001).

Podemos dizer que existe uma ativação do sistema imune, induzida pela doença, resultando em um aumento dos níveis de citocinas próinflamatórias, substâncias angiogênicas e fatores de crescimento produzidos principalmente pelas células peritoneais imunes e pelas células de endometriose (NISOLLE e DONEZ, 1997; AMARAL *et al* 2009; KONDO *et al*, 2011).

Além disso, é entendido que as células endometriais, no contexto da endometriose, apresentam capacidade migratória, invasibilidade e resistência a apoptose (ABRÃO *et al*, 2007b), ou seja, propriedades que dão a esta doença características de expansão e de cronicidade.

1.5 DIAGNÓSTICO

Embora o diagnóstico definitivo da endometriose necessite de uma intervenção cirúrgica, preferencialmente por videolaparoscopia, achados de exames de imagem e laboratoriais já podem prever, com forte grau de confiabilidade, que a paciente apresenta endometriose (NÁUL e SPRINTZER, 2010).

Até os dias atuais, nenhum marcador bioquímico pode ser considerado como de eleição para diagnóstico de endometriose, porém o Ca-125 (quando coletado no primeiro ou segundo dia do ciclo menstrual) pode ser útil para o diagnóstico da endometriose em estágio avançado, principalmente quando os valores são superiores a 100 UI/ml (ABRÃO *et al*, 1999).

O primeiro exame de imagem a ser solicitado na paciente com história e exame físico sugestivo de endometriose é a ultrassonografia pélvica transvaginal, preferencialmente com preparo intestinal, a qual apresenta, dependendo das localizações das lesões, uma acurácia de 76 a 97% (sensibilidade de 94% e especificidade de 98%) (EXACOUSTOS *et al*, 2014). Se o exame é normal, a paciente pode não ter endometriose ou ter doença inicial não-infiltrativa. Por outro lado, se o exame for conclusivo para endometriose ovariana, do septo retovaginal ou retossigmóide ou do trato urinário, o tratamento pode ser indicado sem exames de imagem adicionais (ABRÃO *et al*, 2007a).

Recentemente, a ultrassonografia transvaginal tem sido relatada com uma excelente ferramenta no diagnóstico da endometriose profunda em diferentes localizações: septo retovaginal, retrocervical, áreas paracervicais, reto e sigmóide e parede vesical (CARNEIRO *et al*, 2013).

A presença de massas ovarianas com hipótese diagnóstica duvidosa pode ser mais bem avaliada com a ressonância magnética. Alterações sugestivas de doença do septo retovaginal, ligamentos úterossacros ou do retossigmóide podem ser confirmadas por ecoendoscopia retal ou ressonância magnética (NÁUL e SPRITZER, 2010).

1.6 TRATAMENTO

Os tratamentos existentes atualmente para endometriose baseiam-se na indução de amenorréia, seja por atrofia endometrial ou por decidualização. Não há um consenso em relação ao tratamento de pacientes com dor pélvica ou infertilidade (AMARAL *et al*, 2006)

Nas pacientes em que a queixa é de dor pélvica, podemos iniciar um tratamento empírico com anticoncepcionais orais, mesmo sem o diagnóstico definitivo. Se a paciente não melhorar em três meses ou houver a suspeita de endometriose profunda infiltrativa, podemos usar análogos do hormônio liberador de

gonadotrofina (GnRH), por três meses e após seguir manutenção com anticoncepcionais orais. Se a paciente apresentar recidiva da dor, exame de imagem sugestivo de endometrioma maior que 3 cm ou suspeita de aderências, a cirurgia deve ser indicada (KENNEDY *et al*, 2005).

Embora os tratamentos medicamentosos tenham um papel substancial na melhora da dor nas pacientes com endometriose, o seu efeito é temporário (VERCELLINI *et al*, 2009). As mulheres muito sintomáticas normalmente necessitam de tratamento cirúrgico para complementar o tratamento clínico (KONDO *et al*, 2011).

Os tratamentos de reprodução assistida – inseminação intrauterina e fertilização *in vitro* – podem ser indicados para pacientes com endometriose e infertilidade, levando-se em conta o grau da doença, o envolvimento das trompas, a idade, o tempo de infertilidade e a presença de outros fatores associados (KENNEDY *et al*, 2005).

1.7 DESCOBERTAS

Atualmente, muitos grupos de cientistas pesquisam a presença de células-tronco progenitoras no endométrio humano e em modelos experimentais, além de sua correlação com a regeneração endometrial e ciclicidade menstrual. (GARGETT, 2004; CHAN *et al*, 2004; DU e TAYLOR, 2009).

O conceito de que as células-tronco mesenquimais e epiteliais remanescentes do período embrionário e localizadas na camada basal do endométrio seriam responsáveis por sua intensa atividade regenerativa foi proposto anos atrás. Sob estímulo hormonal as células-tronco endometriais migrariam da camada basal do endométrio originando células progenitoras com linhagem celular específica como epiteliais, estromais e vasculares (PRIANISHNIKOV, 1978 e PADYKULA, 1991 apud FETTBACK, 2010).

Nos últimos anos postulou-se que o processo de regeneração celular poderia ser dependente de células-tronco localizadas em nichos específicos do endométrio e que, quando submetidas a determinados estímulos sistêmicos, como altas concentrações de estradiol, poderiam migrar para outras localizações e gerar grupos de células progenitoras com o potencial de diferenciação em outros tipos celulares epiteliais, estromais e vasculares (OLIVEIRA *et al*, 2010).

Em 2004 um grupo de pesquisa se empenhou em comprovar a presença de células-tronco progenitoras no endométrio. Esses pesquisadores demonstraram que o endométrio humano possui um pequeno grupo de células que exibem capacidade clonogênica. Foi visto que a presença de uma pequena quantidade de células epiteliais (0,22%) e estromais (1,25%) iniciam a formação de colônias em meio contendo soro e apresentam alto potencial de proliferação celular (CHAN *et al*, 2004).

Um estudo recente demonstrou a presença da expressão de genes relacionados à atividade das células-tronco no endométrio tóxico, nas lesões de endometriose superficial e profunda e no peritônio normal (FETTBACK, 2010).

1.8 CÉLULAS MESENQUIMAIS

As células-tronco estão presentes durante os estágios de desenvolvimento embrionário, mas também podem ser identificadas em determinados tecidos adultos (GARRETT, 2004). As células-tronco adultas são encontradas em estruturas anatômicas, denominadas nichos, que são microambientes com comunicação por sinais, que mantém a homeostasia/autorregulação, proliferação, diferenciação e apoptose (SASSON e TAYLOR, 2008). Nos últimos anos, tais células têm sido identificadas em diversos órgãos, incluindo a medula óssea, mama, próstata, cérebro, fígado, tecido adiposo e, mais recentemente, em tecidos ginecológicos, como endométrio, ovário e placenta (GARRETT, 2004; CHAN *et al*, 2004).

Uma das fontes mais utilizadas para extração de células-tronco adultas é a medula óssea, amplamente estudada face ao uso clínico em transplantes. Nesse tecido, encontramos dois tipos de células-tronco: as hematopoiéticas e as mesenquimais (SCHWINDT *et al*, 2005). Estas últimas se diferenciam em adipócitos, condrócitos, osteócitos, monócitos, neurônios, astrócitos, endotélio, hepatócitos, células pulmonares, células intestinais, pele e endométrio (VIDANE *et al*, 2013).

Além da medula óssea, vários outros tecidos possuem suas próprias células-tronco mesenquimais, como sangue periférico, tecido adiposo e sangue de cordão umbilical, entre outros (SCHWINDT *et al*, 2005) e elas podem estar presentes também margeando vasos sanguíneos, onde são denominadas células perivasculares ou pericitos, sendo “ativadas” quando há lesão endotelial (MUNDRA *et al*, 2013).

A existência de células-tronco não-hematopoiéticas na medula óssea foi inicialmente sugerida por Cohnhein, há mais de 130 anos (SCHWINDT *et al*, 2005). No entanto, foi com os achados de Friedestein *et al*, em meados de 1970, que essa teoria veio a ser comprovada com a descoberta das células-tronco mesenquimais (FRIEDENSTEIN *et al*, 1974). Eles encontraram, em uma cultura de células da medula óssea, uma população de células aderidas ao plástico em forma de fuso, semelhantes à fibroblastos. Observaram também que essas células possuíam capacidade para se diferenciar em colônias que lembravam depósitos de osso ou cartilagem (MEIRELLES *et al*, 2009).

Até hoje, o cultivo de células-tronco mesenquimais é feito selecionando-se as células com propriedade de adesão ao plástico, enquanto as células que permanecem em suspensão são facilmente removidas. Outros tipos celulares “contaminantes” (como macrófagos e linfócitos) são eliminados após determinado número de passagens (SHWINDT *et al*, 2005; MEIRELLES *et al*, 2009; BYDLOWSKI *et al*, 2009)

As células mesenquimais são hoje consideradas ideais para a terapia celular por não apresentarem imunogenicidade, por terem a capacidade de se diferenciar em diferentes tecidos e por secretarem fatores imunomoduladores e fatores regenerativos/reparadores. Sua relação com o reparo tecidual é hoje uma das suas maiores aplicações (DOORN *et al*, 2012).

Os efeitos imunomoduladores das células mesenquimais se mostram na secreção de fatores que diminuem a proliferação de linfócitos T CD4 e CD8, de linfócitos B, células dentríticas e *natural killers*; na alteração da maturação de células apresentadoras de antígenos; na alteração do perfil pró-inflamatório dos linfócitos T *hellper* 1 em linfócitos T *hellper* 2 (anti-inflamitórios) e na diminuição da secreção de proteínas inflamatórias: TNF- α (*tumoral necrosis factor α*) e INF- γ (*interferon- γ*) (PHINNEY e SENSEBÉ, 2013).

Portanto, apesar das células mesenquimais serem primariamente utilizadas na regeneração, seus efeitos sobre as células do sistema imunológico e a sua secreção de fatores de crescimento, abriu novos caminhos clínicos para sua utilização (MUNDRA *et al*, 2013).

Há quem considere que o sistema reprodutor humano é considerado uma fonte valiosa de células mesenquimais, porém tal afirmação necessita de maiores investigações (BIEBACK *et al*, 2012).

Em 2009 um grupo de pesquisa propôs que, em humanos, células de medula óssea transplantadas poderiam participar do processo de regeneração endometrial nas pacientes receptoras (DU e TAYLOR, 2009). As células mesenquimais derivadas da medula óssea também contribuem para o crescimento do endométrio e para sua regeneração e desempenham algum papel na progressão da endometriose (VIDANE *et al*, 2013).

1.9 CÉLULAS MESENQUIMAIS E ENDOMETRIOSE

Nos últimos anos a potência terapêutica das células mesenquimais tem sido atribuída à secreção de um grande número de fatores com potenciais angiogênicos, tróficos, imunomoduladores e anti-inflamatórios (PHINNEY e SENSEBÉ, 2013).

As mais importantes características clinicamente relevantes das células mesenquimais são a sua disponibilidade para crescer em cultura, a sua baixa imunogenicidade e a sua capacidade imunossupressora e (LI *et al*, 2012). Essa capacidade imunossupressora só existe quando essas células estão expostas a níveis suficientemente altos de citocinas pró-inflamatórias (LI *et al*, 2012; DE MIGUEL *et al*, 2012; SHI *et al*, 2010).

Muitas pesquisas estão utilizando células mesenquimais para tratar doenças imunológicas em humanos, uma vez que estas células modulam a função imune das populações celulares envolvidas na inflamação (Linfócitos T, Linfócitos B, *Natural Killers* e células apresentadoras de antígenos) (ABUMAREE *et al*, 2012). Nesse sentido, as células mesenquimais são utilizadas no reparo tecidual, nas doenças auto-imunes e na prevenção da doença do enxerto *versus* hospedeiro (MUNDRA *et al*, 2013).

Nesse cenário, temos por um lado a endometriose, que é uma doença com características inflamatórias (IHLENFELD *et al*, 2005), e por outro lado, as células mesenquimais, com a liberação de fatores imunomoduladores (DOORN *et al*, 2012). E como um ambiente inflamatório é necessário para que as células mesenquimais exerçam sua função de imunomodulação (DE MIGUEL *et al*, 2012), esse ambiente é o encontrado na endometriose, uma vez que os focos ectópicos de endométrio são ativadores do sistema imune (AMARAL *et al* 2009; KONDO *et al*, 2011).

Fato importante na correlação das células mesenquimais na endometriose, porém, dessa vez como um efeito positivo de uma sobre a outra, é a descoberta de

que a transição epitélio-mesênquima, que é um processo que consiste em uma série de mudanças no fenótipo de células epiteliais e que fazem com que estas assumam características de células mesenquimais (com maior capacidade migratória, maior capacidade de invasão e de elevada resistência a apoptose) pode estar envolvida na fisiopatogenia da endometriose (POPPE, 2013; MATSUZAKI e DARCHA, 2014).

Em etapas específicas da embriogênese, as células epiteliais de certos epitélios possuem uma capacidade diferenciada de transformação, de modo que parecem alternar entre as características de células epiteliais e células mesenquimais. As células epiteliais são justapostas, polarizadas e unidas entre si através de moléculas de adesão, porém possuem plasticidade fenotípica, processo no qual podem passar por várias mudanças, como perda da capacidade de adesão e da sua polaridade o que as tornam fenotipicamente semelhantes às células mesenquimais, com capacidade de locomover-se e de invadir tecidos (GOMES *et al*, 2011).

Também é sabido que o endométrio é derivado da mesoderme intermediária através da transição epitélio-mesênquima durante o desenvolvimento do sistema urogenital (MATSUZAKI e DARCHA, 2014).

Assim, levando em conta a semelhança entre as características da transição epitélio-mesenquimal com as características da endometriose, um novo caminho se abriu no entendimento da fisiopatologia da doença (POPPE, 2013).

A partir dos estudos de Mambelli *et al* (2013) e de Jing *et al* (2014) que utilizaram-se de células mesenquimais para verificar a regeneração endometrial, pôde-se afirmar que essas células tiveram potencial para tal fato. No primeiro estudo dispôs-se de células mesenquimais para o tratamento de endometriose em éguas (doença degenerativa no endométrio diretamente relacionada a problemas de fertilidade em equinos). Nessa pesquisa as células infundidas intra-útero foram capazes de fazer proliferar o endométrio danificado das éguas (MAMBELLI *et al*, 2013). Já no segundo estudo aplicaram-se células mesenquimais para constatar o aumento da espessura de uma camada de endométrio em ratas. Nessa pesquisa as células mesenquimais infundidas na forma endovenosa mostraram efeito benéfico sobre o crescimento do endométrio e o seu papel imunomodulador (aumento de citocinas anti-inflamatórias) (JING *et al*, 2014).

1.10 MODELOS EXPERIMENTAIS E ENDOMETRIOSE

A complexidade na fisiopatologia e a heterogeneidade da doença em humanos fazem da endometriose uma das doenças mais estudadas da atualidade e, para facilitar estes estudos, alguns modelos experimentais tem sido propostos. (ROSA E SILVA e NOGUEIRA 2004).

Um bom modelo experimental animal é necessário para pesquisa, com o objetivo de elucidação do mecanismo da doença e desenvolvimento de novas terapêuticas, porém a endometriose ocorre espontaneamente apenas em primatas, que são muito onerosos para uso experimental (HIRATA *et al*, 2005).

Os modelos endometriais têm sido criados cirurgicamente em pequenos animais, tais como coelhas, ratas e camundongas (KONDO *et al*, 2011).

O método proposto por Jones (JONES, 1984) para indução de endometriose em ratas é o mais amplamente utilizado em pesquisas. Neste modelo é realizado um auto-transplante de um fragmento uterino com a face endometrial voltada para a cavidade peritoneal.

No trabalho de Rosa e Silva e Nogueira, em 2004, os autores comparam, através da literatura, que ratas, apesar de serem modelos experimentais bem acessíveis com lesões homogêneas e com manejo fácil (BERTHET *et al*, 1992 apud, ROSA E SILVA e NOGUEIRA, 2004), possuem um pequeno porte, o que dificulta a técnica cirúrgica das mesmas. Já coelhas passam a ser uma boa opção de modelo experimental, pois, além do maior tamanho, também apresentam lesões homogêneas, geralmente massas sólidas e hemorrágicas, facilmente obtidas por meio de auto-transplante de fragmentos endometriais ou abertura e exposição da cavidade endometrial (MANYAK *et al*, 1990 apud ROSA E SILVA e NOGUEIRA, 2004).

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVO GERAL

- Avaliação do efeito das células mesenquimais na fertilidade de coelhas com implantes retrocervicais de endometriose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparação do tempo de início do período fértil e dos desfechos obstétricos nos animais expostos e não expostos à terapia celular.

- Análise da evolução do implante de endometriose e classificação histológica.

- Comparação do inventário da cavidade pélvica nos grupos Endometriose, Controle e Mesenquimal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Após a aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA- PUCPR-projeto n° 710 C) foram utilizadas na pesquisa 29 coelhas adultas (com 6 a 8 meses de idade) da linhagem Nova Zelândia, com peso compreendido entre 3 a 4 kg, sendo 27 para compor a amostra e duas para a coleta da medula óssea.

Foram seguidos os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).

Os animais ficaram no biotério da PUC-PR acomodados um em cada gaiola, com dimensões padrão de 50 x 50 x 50 cm de largura, profundidade e altura, respectivamente, as quais apresentavam as grades inferiores de tamanho reduzido, para não haver a possibilidade das patas ficarem presas e ocorrerem fraturas ou lesões.

A temperatura ambiente foi de 18 a 22°C com umidade de 45 a 65%. A luminosidade seguiu a prática de manter 12 horas de luz por 12 horas de escuro. A alimentação foi composta de ração específica para coelhos (nuvital) e de água *ad libidum*. No local ocorreu troca da ventilação a cada 10-15 horas para eliminação de odores e gases. O ruído do ambiente do biotério foi controlado para haver 50 a 60 dB no local onde permaneceram os animais.

As coelhas foram pesadas no dia da cirurgia e posteriormente uma vez por semana no seguimento, para se certificar de que os grupos foram mantidos sob mesmas condições de alimentação, luz e temperatura, não havendo, portanto, interferências das condições ambientais nos resultados.

Para os procedimentos cirúrgicos e para a extração e cultivo das células mesenquimais utilizaram-se o laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental e o laboratório de Terapia Celular, ambos da PUC-PR.

Dividiram-se então as coelhas em três grupos de 9 cada um.

No grupo Controle (grupo C), foi realizada apenas a retirada de um fragmento do corno uterino. As coelhas possuem útero bicornos com duas cérvix (BISHOP, 2002). No grupo Endometriose (grupo E), foi desenvolvida a aplicação do implante através de um retalho do fragmento uterino retirado do próprio animal. No grupo Mesenquimal (grupo M) desenvolveu-se também o implante, porém, esses animais receberam as células mesenquimais 21 dias após o implante ser realizado.

Na indução anestésica foi utilizada uma combinação de xilazina na dose de 5-10 mg/kg com quetamina na dose de 30-50 mg/kg. A via foi a intramuscular (no quadríceps). A quetamina causa sedação e a xilazina o bloqueio muscular. (PAIVA *et al*, 2005). Após o animal estar em decúbito canulou-se a veia marginal da orelha para a introdução de fluidoterapia e, para quando necessário, a introdução de anestésicos (Xilazina 1mg/kg e quetamina 3 mg/kg).

Após o procedimento cirúrgico as coelhas permaneceram no biotério da PUC-PR sob os cuidados descritos acima, evitando-se ao máximo a manipulação, barulhos e ações que poderiam estressar os animais.

Para a analgesia pós-operatória utilizou-se dipirona sódica (Algivet®) na dose de 25mg/kg, IM de 12 em 12 horas por 3 dias.

A eutanásia de cada coelha ocorreu distante das demais. Para realização do procedimento utilizou-se quetamina e xilazina, nas doses descritas acima para anestesia e quando os animais estiveram sob anestesia profunda aplicou-se o dobro da dose anestésica. A confirmação da morte deu-se pela ausência de movimentos respiratórios, de batimentos cardíacos e da perda dos reflexos, como o córneo-palpebral.

Para análise histológica foi utilizada a coloração de Hematoxilina e Eosina e a classificação da lesão foi realizada através do índice de Keenan, que avalia a persistência das células epiteliais nos implantes (KEENAN, 1997). Esta classificação é dada da seguinte forma: escore 3: camada epitelial bem preservada, escore 2: epitélio moderadamente preservado com infiltrado leucocitário, escore 1: epitélio mal preservado (apenas células epiteliais ocasionais), escore 0: nenhum epitélio.

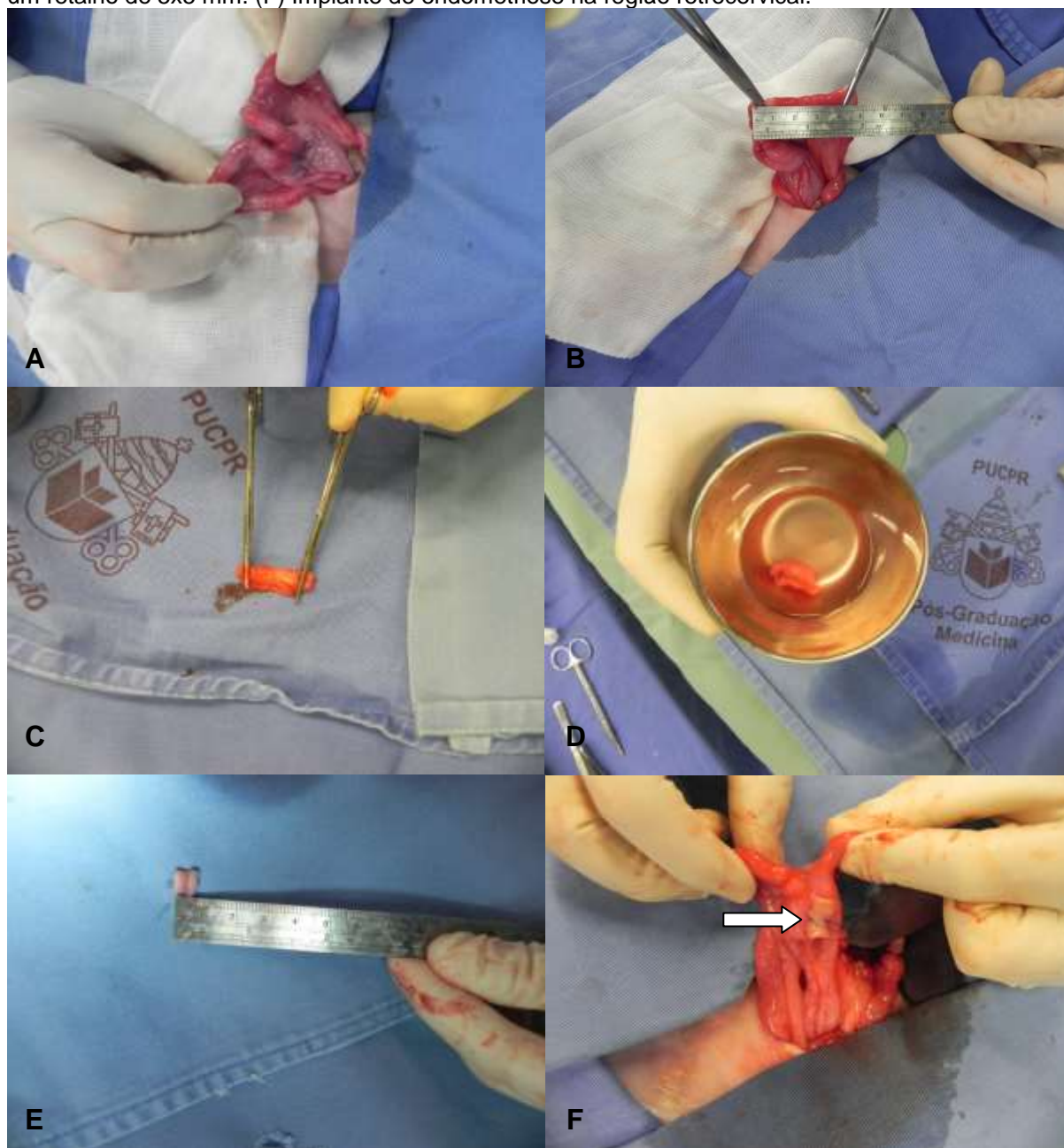
3.1 GRUPO ENDOMETRIOSE

3.1.1 Procedimento cirúrgico

Para a realização do grupo Endometriose, inicialmente foi feita uma incisão mediana na parede abdominal, de 4 cm, iniciando a dois cm da sínfise púbica. Retirou-se então um fragmento de quatro cm do corno uterino direito (padronização). Esse fragmento foi imerso em solução salina de 0.9% à 4 ° C por 2 minutos e, após, foram confeccionados retalhos de 5x5 mm (25 mm² de área) e estes então foram suturados com fio prolene 3.0 na região retrocervical (atrás do colo uterino) com a

face endometrial voltada para a cavidade abdominal. A parede foi fechada nos planos muscular e aponeurótico (Figura 1 A-F).

Figura 1. (A) Identificação do útero bicorno da coelha. (B) Medição de 4 cm do corno uterino direito. (C) Fragmento do corno uterino ressecado. (D) Imersão do fragmento em SF 0,9%. (E) Confeção de um retalho de 5x5 mm. (F) Implante de endometriose na região retrocervical.



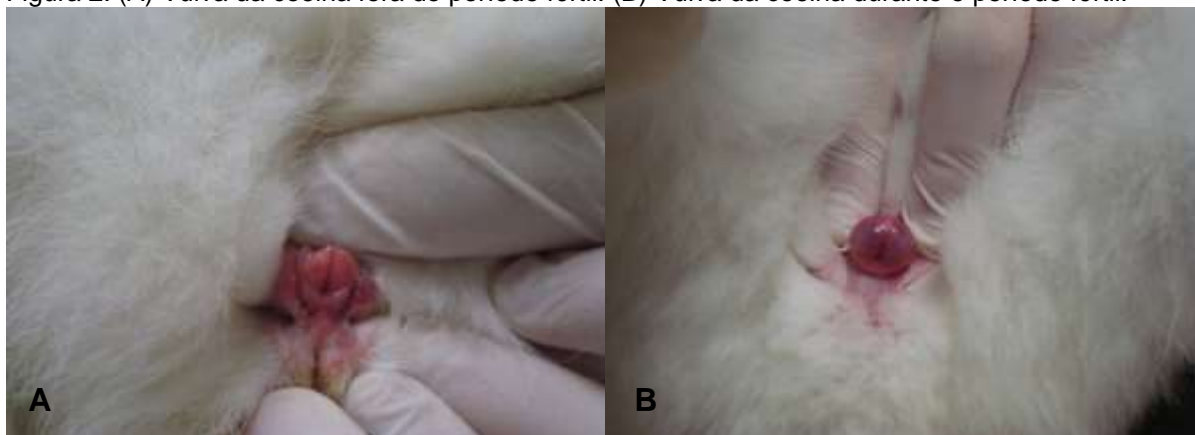
Fonte: a autora, 2012.

3.1.2 Pós-operatório e fertilidade

Aguardou-se o tempo de 21 dias para dar início às cópulas. Esse tempo é o mínimo necessário para que ocorra o desenvolvimento da doença, ou seja, para que o endométrio implantado se torne secretor (SCHOR *et al*, 1999; BUDEL, 2011).

As cópulas ocorreram em 4, 6 e 9 semanas após a cirurgia, no momento em que as coelhas estavam férteis. Para a verificação da fertilidade, utilizou-se a avaliação diária da coloração da vulva, ou seja, aquelas que se encontravam vermelho/violáceas (diferentemente da cor esbranquiçada habitual) foram postas junto com um macho para copular. (BISHOP, 2002; PTASZYNSKA, 2007); (Figura 2 A e B).

Figura 2. (A) Vulva da coelha fora do período fértil. (B) Vulva da coelha durante o período fértil.



Fonte: a autora, 2012.

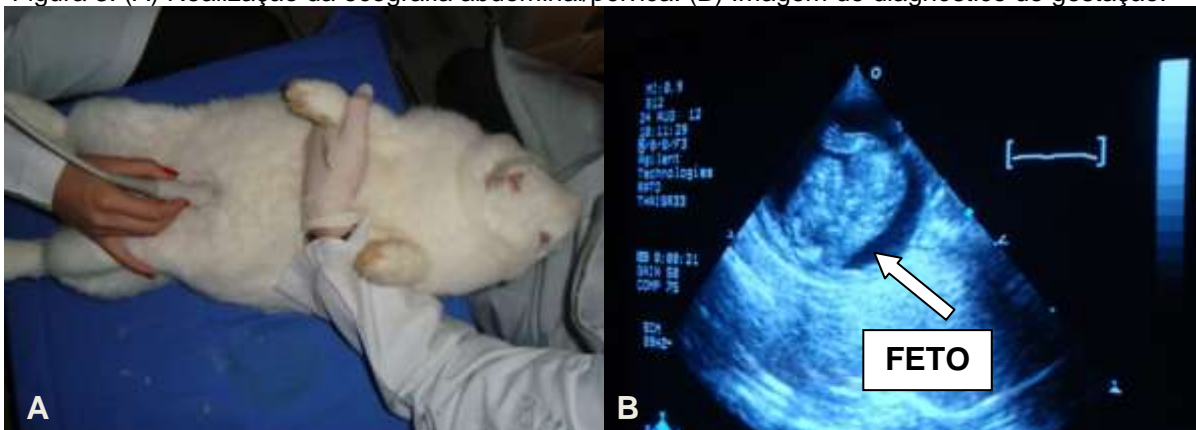
3.1.3 Diagnóstico da gestação e nascimento

Foram realizadas ecografias abdomino-pélvica durante as idades gestacionais de 7 a 23 dias. Nesse momento foi verificado se havia sinais de gestação (presença de saco gestacional, fetos) ou não (Figura 3 A e B).

A ecografia é um bom método para o diagnóstico de gestação em coelhas, assim como para se verificar a viabilidade do feto (BISHOP, 2002).

Aguardou-se então o tempo de gestação de 30 a 33 dias (BISHOP, 2002; PTASZYNSKA, 2007) e o nascimento dos filhotes das que se encontravam prenhes. Os mesmos foram eutanasiados após o nascimento, através do método mecânico de decapitação, indicado para neonatos roedores (ZAIA, 1990; PAIVA *et al*, 2005).

Figura 3. (A) Realização da ecografia abdominal/pélvica. (B) Imagem de diagnóstico de gestação.



Fonte: a autora, 2012.

3.1.4 Verificação dos implantes

A eutanásia ocorreu de 10 e 12 semanas após a realização dos implantes, seguindo os procedimentos já descritos acima.

Os implantes foram fotografados, medidos e então retirados, fixados e colocados em bloco de parafina para posterior análise histológica (Figura 4).

Figura 4. Implante de endometriose após eutanásia do grupo Endometriose.



Fonte: a autora, 2012.

3.2 GRUPO CONTROLE

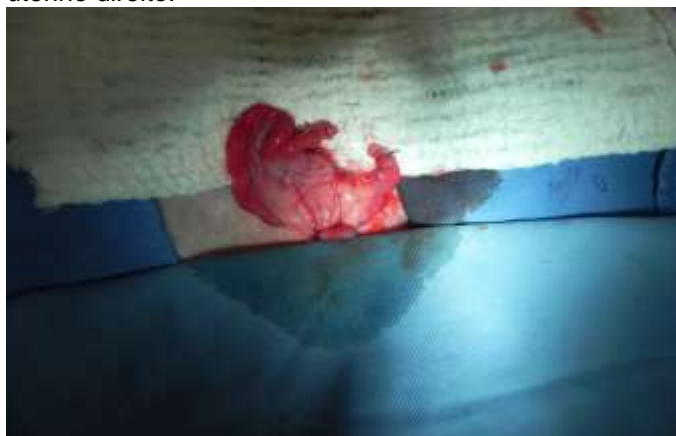
3.2.1 Procedimento cirúrgico

Para a realização do grupo Controle, realizou-se a retirada de um fragmento do corno uterino, seguindo a mesma técnica descrita para o grupo Endometriose, porém, nesse grupo, não foi realizado o implante endometriótico (Figura 5).

A parede foi fechada nos planos muscular e aponeurótico.

Esse grupo foi criado para se verificar se a infertilidade foi advinda da endometriose criada e não apenas da manipulação do útero do animal.

Figura 5. Ressecção de fragmento de 4 cm do corno uterino direito.



Fonte: a autora, 2012.

3.2.2 Pós-operatório e fertilidade

Aguardou-se o tempo de 21 dias para dar início às cópulas. Esse intervalo foi utilizado para padronizar os três grupos da pesquisa, pois nos grupos em que foi realizado o implante de endometriose, esse tempo é o mínimo necessário para que ocorra o desenvolvimento da doença (SCHOR *et al*, 1999; BUDDEL, 2011).

As cópulas ocorreram em 4, 6 e 7 semanas após a cirurgia, no momento em que as coelhas estavam férteis. Para a verificação da fertilidade, utilizou-se mesma técnica descrita acima, baseada na coloração avermelhada/violácea da vulva e então as férteis foram sendo colocadas junto aos machos.

3.2.3 Diagnóstico da gestação e nascimento

Foram realizadas ecografias abdominais durante as idades gestacionais de 21 a 25 dias. Nesse momento também foi verificada a presença de gestação, conforme descrito acima.

Aguardou-se então o nascimento dos filhotes das que se encontravam prenhes. Os mesmos também foram eutanasiados após o nascimento.

3.2.4 Eutanásia

A eutanásia ocorreu de 10 e 12 semanas após a cirurgia, seguindo os procedimentos descritos acima.

3.3. GRUPO MESENQUIMAL

3.3.1 Procedimentos cirúrgicos

Para a criação da doença no grupo Mesenquimal seguiu-se a mesma técnica do grupo Endometriose.

Foi aguardado um período de tempo de 21 dias para que o implante desenvolvesse a lesão.

3.3.2 Extração e cultivo das Células Mesenquimais

As células mesenquimais foram obtidas 12 semanas antes da sua aplicação, através da extração da medula óssea de duas coelhas (3.400g e 3.800 g).

A medula óssea foi processada no Laboratório Experimental de Cultivo Celular da PUCPR. Para a coleta, as duas fêmeas foram eutanasiadas (seguindo o mesmo protocolo já descrito acima) e então retirados seus ossos longos (Figura 6 A). Sobre uma placa de Petri contendo tampão salino fosfatado (PBS) (Gibco™ Invitrogen, New York, USA), foi retirada toda a musculatura ao redor dos ossos e estes foram transferidos para outra placa de Petri. Com auxílio de uma pinça saca-bocado, foram retiradas as epífises dos ossos e realizada a lavagem para retirada da medula óssea, com uma seringa contendo heparina sódica (Cristália, São Paulo,

Brasil) e meio de cultura Dullbeco modificado por Eagle (DMEM) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) (Figura 6 B). A medula e o meio de cultura foram recolhidos em um tubo cônico de 50 mL (TPP, Trasadingen, Switzerland) (Figura 6 C).

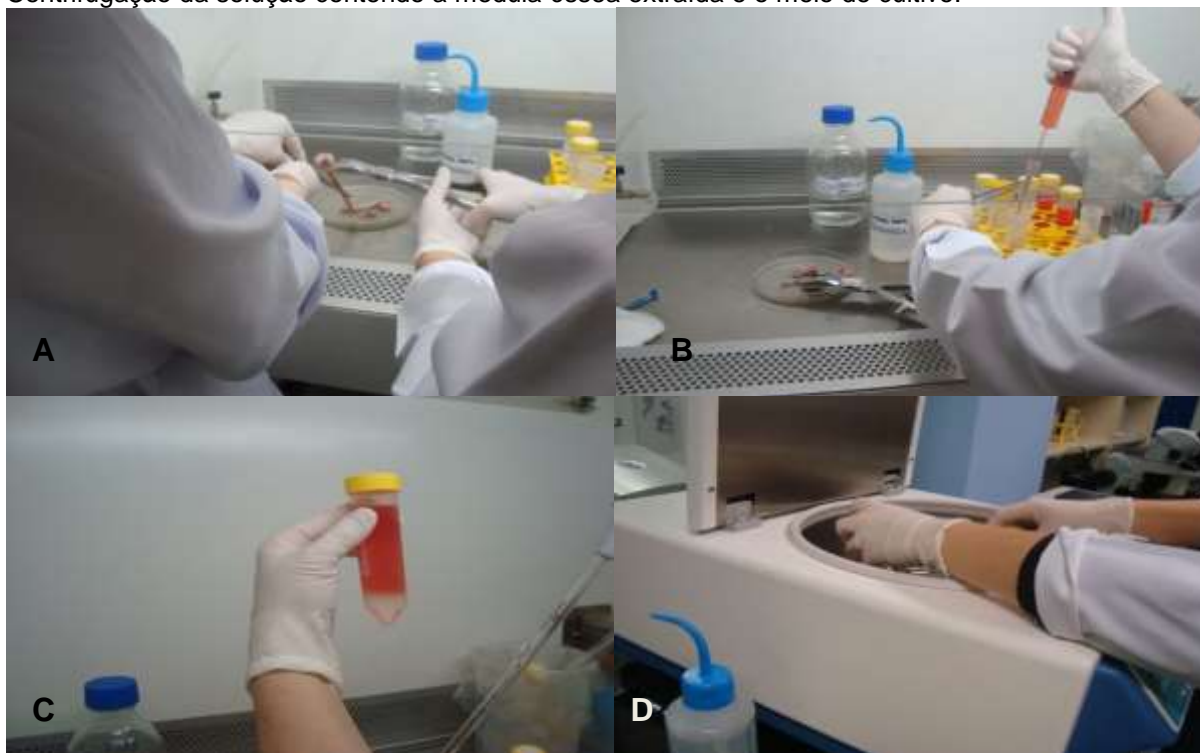
A medula óssea foi diluída em meio de cultura DMEM e colocada sobre um gradiente de densidade Ficoll-Hypaque ($d=1,077 \text{ g/cm}^3$) (Sigma Chemical, St. Louis, USA) para isolamento das células mononucleares (Böyum A, 1968). Após a centrifugação de 400 g durante 40 minutos (Figura 6 D), foi retirado o anel de células mononucleares (Figura 7 A), e feita duas lavagens com meio de cultura a 400 g durante 10 minutos, para a retirada do excesso de ficoll-hypaque. O botão de células foi ressuscitado em meio DMEM suplementado com 15% de soro bovino fetal (Gibco™ Invitrogen, New York, USA) e 1% de antibiótico (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL) (Gibco™ Invitrogen, New York, USA). As células do anel celular foram retiradas (Figura 7 B) e então contadas em câmara de Neubauer (Figura 7 C) e plaqueadas em frascos de cultura celular com 75 cm² de área (TPP, Trasadingen, Switzerland) numa concentração de 1×10^5 células/cm². Os frascos de cultivo foram mantidos em estufa com 5% de CO₂ e feita a troca de meio duas vezes por semana. A cada troca de meio foram eliminadas as células da linhagem hematopoiética (células em suspensão) e mantidas as células aderentes (células-tronco mesenquimais) (Figura 7 D).

As células mesenquimais foram identificadas, através de dois critérios oriundos da Sociedade Internacional de Terapia Celular (MUNDRA, *et al* 2013): células que se proliferam *in vitro* e que são aderentes ao plástico. O terceiro critério não foi aplicado (citometria de fluxo com positividade para CD15, CD 73 e CD90 e negatividade para CD34, CD16, CD45, CD11a e HLADR), pois ainda não há um painel de citometria de fluxo específico para coelhos no Laboratório de Terapia Celular da PUCPR.

Quando foi observada 80% de confluência celular, as células foram dissociadas do frasco de cultivo utilizando 0,25% de tripsina/EDTA (Invitrogen™, New York, USA) e replaqueadas (passagem 1) para a expansão celular.

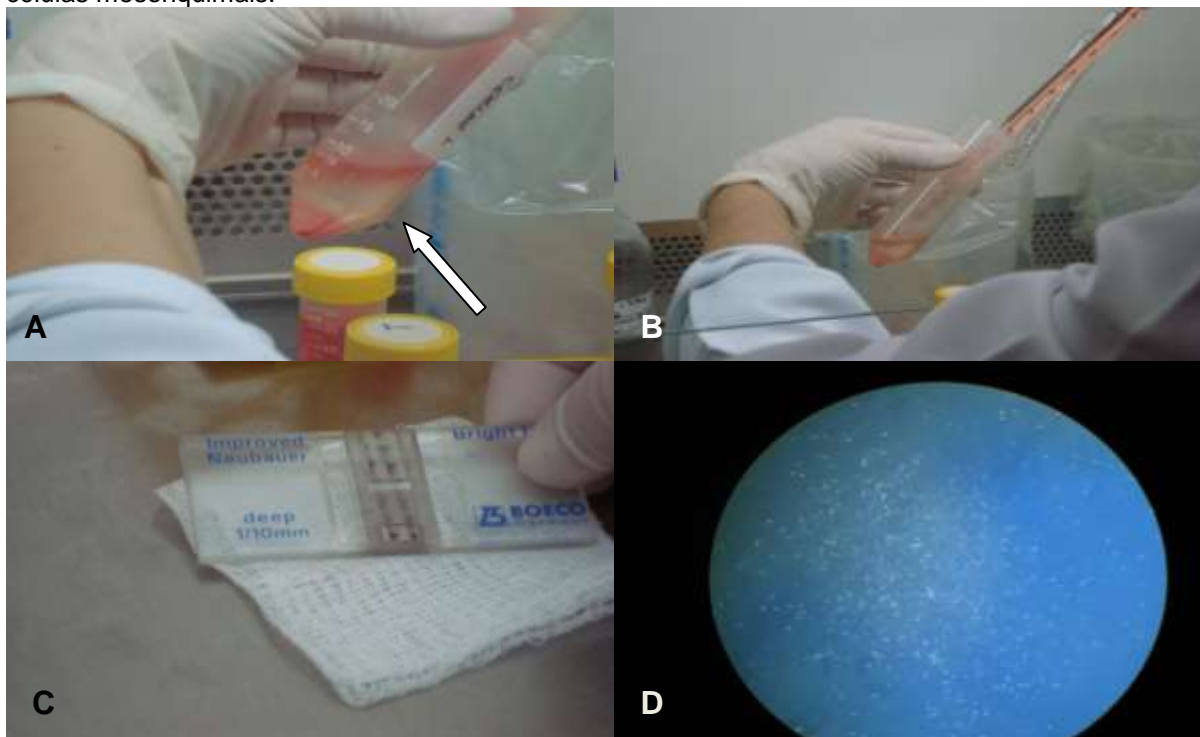
A seguir, as células mesenquimais foram então congeladas até a data próxima da sua utilização.

Figura 6. (A) Extração dos ossos longos das coelhas. (B) Extração da medula óssea dos ossos longos. (C) Medula óssea retirada juntamente com o meio de cultivo, no tubo cônico. (D) Centrifugação da solução contendo a medula óssea extraída e o meio de cultivo.



Fonte: a autora, 2012.

Figura 7. (A) Anel celular obtido após a centrifugação da solução. (B) Retirada do anel celular da solução centrifugada. (C) Contagem celular na câmara de Neubauer. (D) Frasco de cultivo com células mesenquimais.



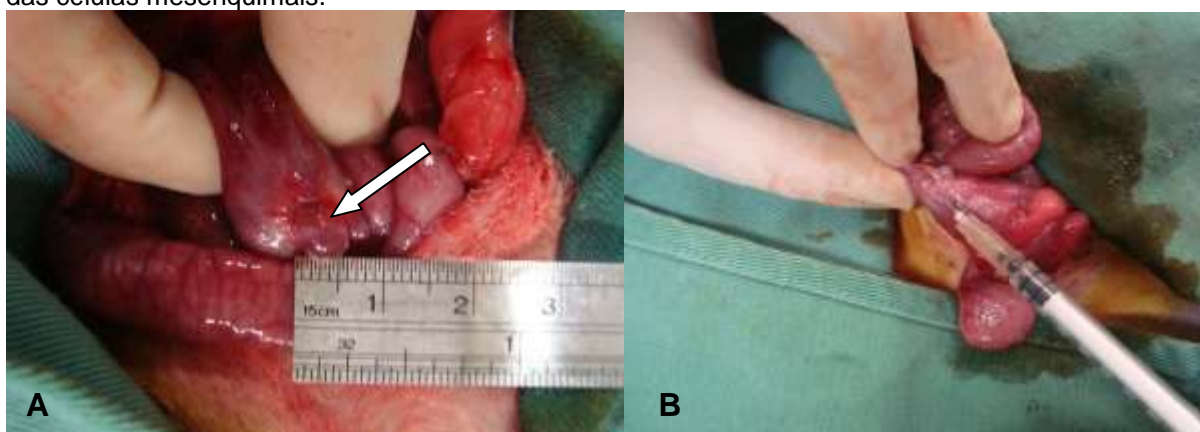
Fonte: a autora, 2012.

3.3.3 Aplicação das Células Mesenquimais

Passados os 21 dias, realizou-se a segunda cirurgia para a aplicação das células mesenquimais. Nessa reoperação verificou-se o tamanho da lesão formada pelo implante (figura 8 A). Todos os implantes foram considerados viáveis (área igual ou superior a 25 cm²).

Foi utilizada a quantidade de 2×10^6 células em cada animal (2ml em uma seringa) e a aplicação ocorreu na borda do implante (Figura 8 B).

Figura 8. (A) Verificação do implante durante a aplicação das células mesenquimais. (B) Aplicação das células mesenquimais.



Fonte: a autora, 2012.

3.3.4 Pós-operatório e fertilidade

Aguardou-se o tempo de 21 dias para dar início às cópulas. Esse intervalo foi utilizado para também padronizar os três grupos da pesquisa. As cópulas ocorreram em 7, 8 e 9 semanas após a cirurgia, no momento em que as coelhas estavam férteis. Para a verificação da fertilidade, utilizou-se mesma técnica descrita acima, baseada na coloração avermelhada/violácea da vulva, e então as férteis foram sendo colocadas junto aos machos.

3.3.5 Diagnóstico da gestação e nascimento

Foram realizadas ecografias abdominais durante as idades gestacionais de 13 a 21 dias. Nesse momento foi verificado se havia sinais de gestação (presença de saco gestacional, fetos) ou não.

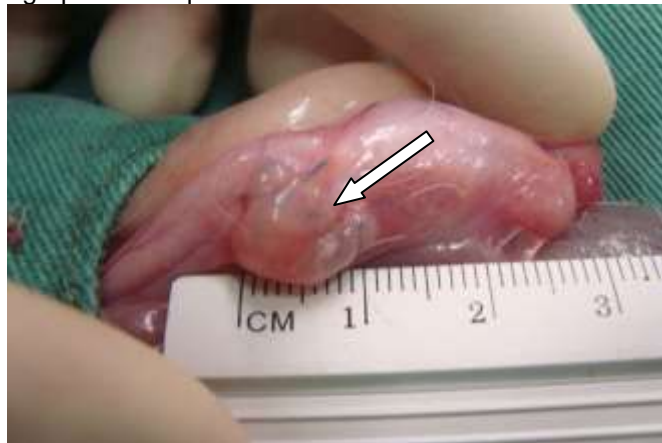
Esperou-se então o nascimento dos filhotes. Como nesse grupo apenas uma ficou prenhe, e esse evoluiu para óbito fetal, foi realizada a eutanásia sem o nascimento, após passada a data provável de parto (30 a 33 dias de gestação) (BISHOP, 2002; PTASZYNSKA, 2007) e não haver nascimento.

3.3.6 Verificação dos implantes

A eutanásia ocorreu 13 semanas após a realização do implante e nove semanas após a aplicação das células mesenquimais sobre os mesmos, seguindo os procedimentos descritos acima.

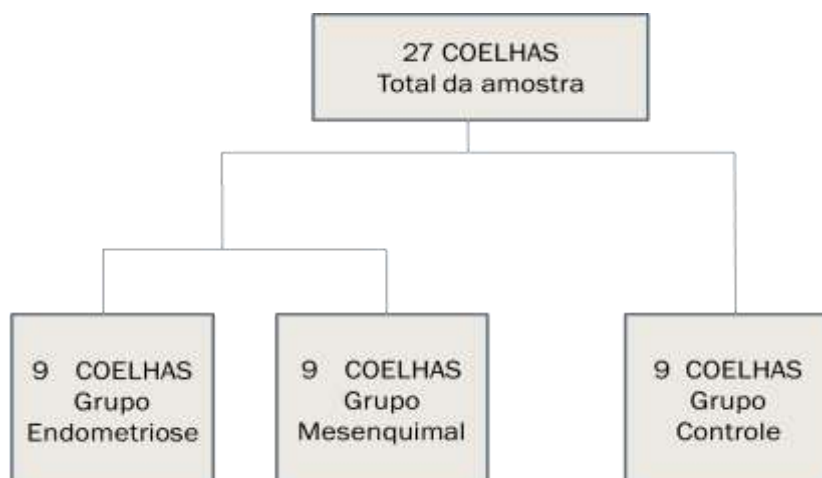
Os implantes foram fotografados, medidos e então retirados, fixados e colocados em bloco de parafina para posterior análise histológica (Figura 9).

Figura 9. Implante endometriótico após a eutanásia do grupo Mesenquimal.

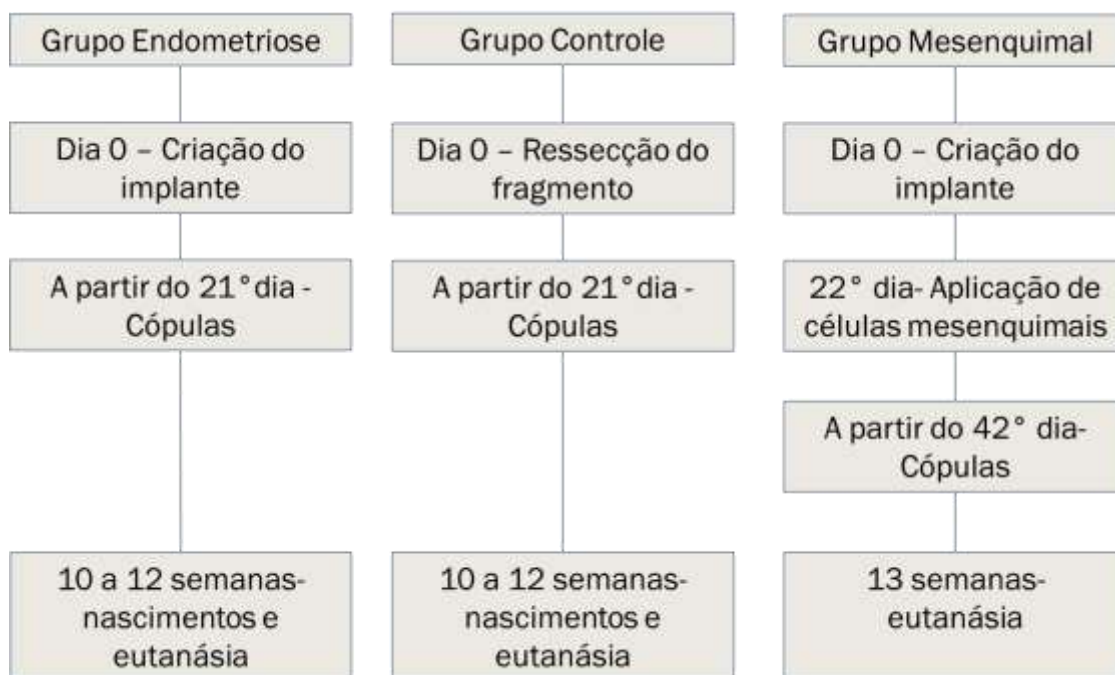


Fonte: a autora, 2012.

3.4 FLUXOGRAMA DO DESENHO DA PESQUISA:



3.5 FLUXOGRAMA DOS EVENTOS OCORRIDOS:



3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Variáveis qualitativas foram descritas por frequências e percentuais e variáveis quantitativas por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões.

Para a comparação dos grupos em relação a variáveis qualitativas dicotômicas foi considerado o teste exato de Fisher. Em relação a variáveis quantitativas os grupos retrocervical e tratamento foram comparados usando-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Para a comparação dos três grupos foi considerado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ou o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional SPSS v.20.0.

4 RESULTADOS

4.1 TAXA DE FERTILIDADE

Sete coelhas do grupo Controle (77,78%) e também sete do grupo Endometriose (77,78%) ficaram prenhes. Do grupo Mesenquimal apenas uma ficou prenhe (11,1%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Avaliação da taxa de fertilidade nos grupos Controle, Endometriose e Mesenquimal, respectivamente, em valor absoluto e em porcentagem.

Fertilidade	Grupos		
	Grupo C	Grupo E	Grupo M
Sim	7 (77,78%)	7 (77,78%)	1 (11,11%)
Não	2 (22,22%)	2 (22,22%)	8 (88,89%)
Total	9	9	9

Fonte: a autora, 2013.

Os grupos foram comparados dois a dois em relação à presença de gestação (sim ou não). Para tanto, testou-se a hipótese nula de que a probabilidade de gestação é igual nos dois grupos versus a hipótese alternativa de que as probabilidades são diferentes; os resultados obtidos foram de $p=1$ para a comparação do grupo Controle com o grupo Endometriose e de $p= 0,015$ para a comparação dos grupos Controle x Mesenquimal e Endometriose x Mesenquimal.

4.2 TEMPO DE INÍCIO DO PERÍODO FÉRTIL

Verificou-se que o tempo para iniciar a fertilidade, depois de realizados os atos operatórios e aguardados os 21 dias, foi diferente intra e intergrupos.

Grupo Controle: mínimo de 16 e máximo de 37 dias para iniciar o período fértil (média de 29 com desvio padrão de 8,9 e mediana de 33).

Grupo Endometriose: mínimo de 14 e máximo de 49 dias para iniciar o período fértil (média de 20,4 com desvio padrão de 12,7 e mediana de 14).

Grupo Mesenquimal: mínimo de 33 dias e máximo de 47 dias para iniciar a fertilidade (média de 38,8 com desvio padrão de 5 e mediana de 40).

O valor de p para a comparação geral dos três grupos foi de $p=0,005$.

Na tabela 2 estão apresentadas as estatísticas descritivas do tempo levado por cada grupo para ficar fértil de acordo com os grupos e o valor de p do teste estatístico e no gráfico 1 a ilustração em Box-plot das mesmas variáveis.

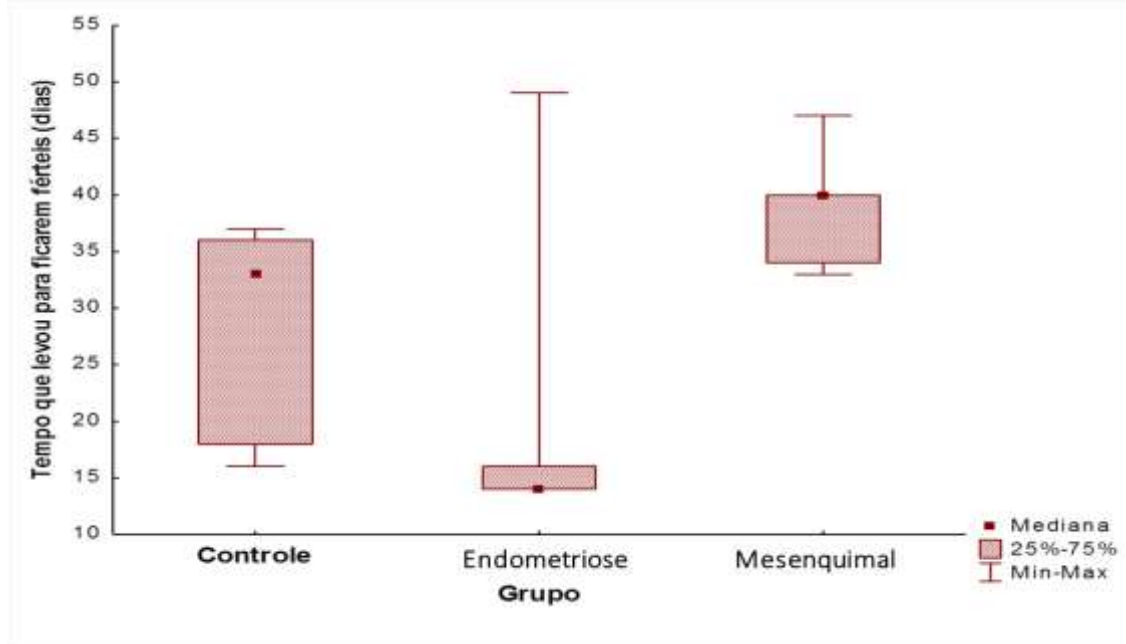
Tabela 2 - Tempo de início do período fértil, em dias, nos grupos Controle, Endometriose e Mesenquimal, respectivamente, após os procedimentos cirúrgicos; $p<0,05$.

Grupo	n	Mediana	Média	Valor de p*
Grupo C	9	33	29±8,9	0,005
Grupo E	9	14	20,4±12,7	
Grupo M	9	40	38,8±5	

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

Fonte: a autora, 2013.

Gráfico 1 - Comparativo intra e intergrupo do tempo para o início do período fértil; Controle x Endometriose $p=0,043$; Controle x Mesenquimal e Endometriose x Mesenquimal $p<0,001$.



Fonte: a autora, 2013.

Considerando-se que foi encontrada diferença significativa entre os grupos, estes foram comparados dois a dois. Os seguintes resultados foram obtidos: $p=0,061$ para a comparação do grupo Controle com o grupo Endometriose e de $p=0,043$ para a comparação do grupo Controle x grupo Mesenquimal e $p<0,001$ para a comparação do grupo Endometriose x grupo Mesenquimal.

4.3 DESFECHOS OBSTÉTRICOS

Como resultados obstétricos obtivemos que o grupo Controle apresentou das sete gestações, dois óbitos fetais – ausência de nascimentos com presença de fetos macerados durante a eutanásia (28,57%), três abortos - perdas fetais antes do término da gestação (42,86%) e dois nascidos vivos (28,57%); já o grupo Endometriose teve dois óbitos fetais (28,57%) e cinco nascidos vivos (71,43%). O grupo mesenquimal teve uma baixa taxa de fertilidade e careceu de maiores análises. Na tabela 3 são apresentadas, para cada grupo, as frequências e os percentuais de acordo com as classificações de desfecho.

Tabela 3. Resultados obstétricos dos grupos Controle, Endometriose e Mesenquimal, respectivamente, em valor absoluto e porcentagem.

Desfecho	Grupo		
	Controle	Endometriose	Mesenquimal
Óbitos fetais	2 (28,57%)	2 (28,57%)	1 (100%)
Abortos	3 (42,86%)	0	0
Nascimentos vivos	2 (28,57%)	5 (71,43%)	0
Total	7	7	1

Fonte: a autora, 2013.

Os grupos foram comparados com a seguinte classificação de desfechos: insatisfatório (óbito/aborto), ou satisfatório (nascidos vivos). Obteve-se como resultado que no grupo Controle cinco animais (71,43%) tiveram como desfecho gestacional óbito fetal/aborto e dois nascidos vivos (28,57%). No grupo Endometriose dois animais (28,57%) tiveram como desfecho gestacional óbito fetal/aborto e cinco nascidos vivos (71,57%). Já no grupo Mesenquimal o único animal prenhe teve como desfecho óbito fetal/aborto (tabela 4). A partir desses resultados, os grupos foram comparados dois a dois. Para tanto, testou-se a hipótese nula de que a probabilidade de nascimento é igual nos dois grupos versus a hipótese alternativa de que as probabilidades são diferentes. Os resultados foram obtidos de $p=0,286$ para a comparação do grupo Controle com o grupo Endometriose e de $p= 1$ para a comparação do grupo Controle x grupo Mesenquimal e $p= 0,375$ para a comparação do grupo Endometriose x grupo Mesenquimal.

Tabela 4. Comparação entre os desfechos nos grupos Controle, Endometriose e Mesenquimal, respectivamente.

Desfecho	Grupo		
	Grupo C	Grupo E	Grupo M
Nascidos vivos (Satisfatório)	2 (28,57%)	5 (71,43%)	0
Óbito fetal/aborto (Insatisfatório)	5 (71,43%)	2 (28,57%)	1 (100%)
Total	7	7	1

Fonte: a autora, 2013.

4.4 COMPARAÇÃO DOS TAMANHOS DOS IMPLANTES

Em todas as coelhas, a área inicial de cada implante era de 25 mm² (5x5mm). Durante as reoperações (eutanásia para o grupo Endometriose e aplicação de células mesenquimais e eutanásia no grupo Mesenquimal) os implantes foram novamente medidos. Neste último grupo, todos os implantes foram considerados viáveis (área ≥ 25mm²).

A diferença dos tamanhos dos implantes em milímetros (final – inicial) foi caracterizada por média de 55,1 mm² para o grupo Endometriose (desvio padrão de 45,9) e de 82,7 mm² para o grupo Mesenquimal (desvio padrão de 107,9), com ambos apresentando mediana de 55 mm². O valor de p foi de 0,863.

Na tabela 5 estão apresentadas as estatísticas descritivas em cada grupo e no gráfico 2 a ilustração em Box-plot das mesmas variáveis. As imagens dos implantes nos grupos Endometriose e Mesenquimal, após a eutanásia podem ser vistos na figura 10 A e B.

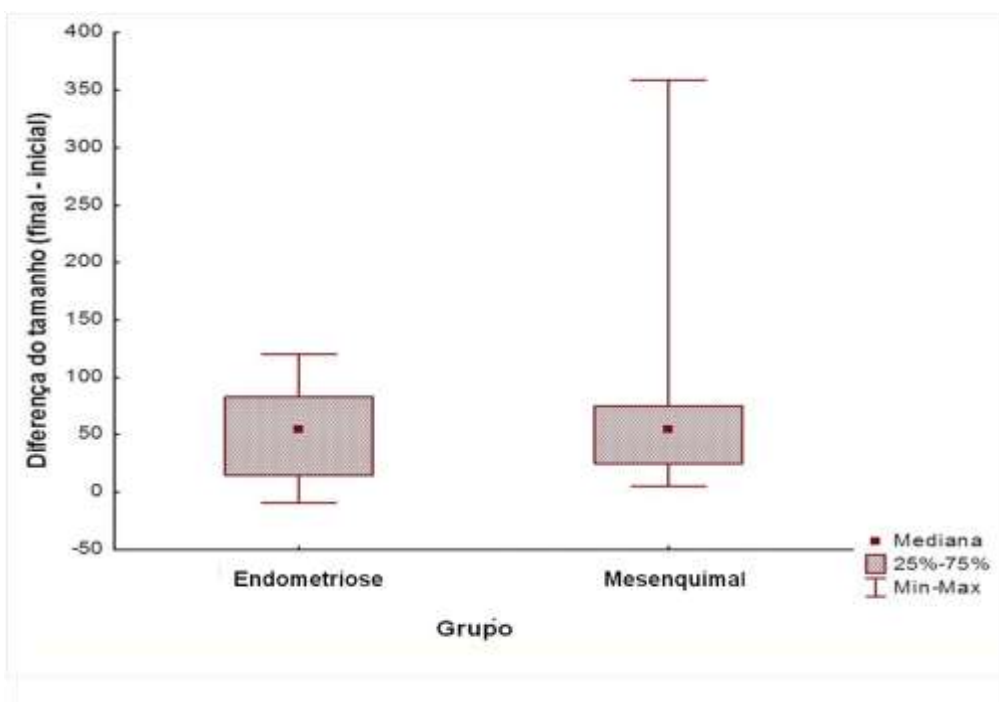
Tabela 5. Diferença no tamanho dos implantes, em mm², nos grupos Endometriose e mesenquimal, respectivamente, durante a eutanásia; p=0,863.

Grupo	n	Mediana	Média	Valor de p*
Grupo E	9	55	55,1±45,9	0,863
Grupo M	9	55	82,7±107,9	

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, p<0,05.

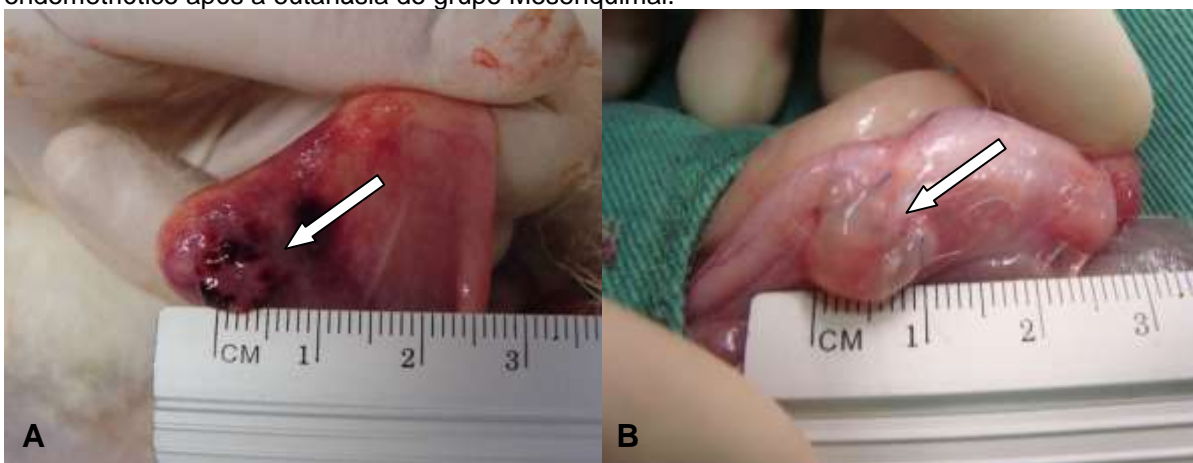
Fonte: a autora, 2013.

Gráfico 2 - Demonstrativo da diferença do tamanho dos implantes endometriais, em milímetros, nos grupos Endometriose e Mesenquimal; $p=0,863$.



Fonte: a autora, 2013.

Figura 10. (A) Implante endometriótico após eutanásia no grupo Endometriose. (B) Implante endometriótico após a eutanásia do grupo Mesenquimal.



Fonte: a autora, 2012.

4.5 COMPARAÇÃO DA MACROSCOPIA NAS REOPERAÇÕES

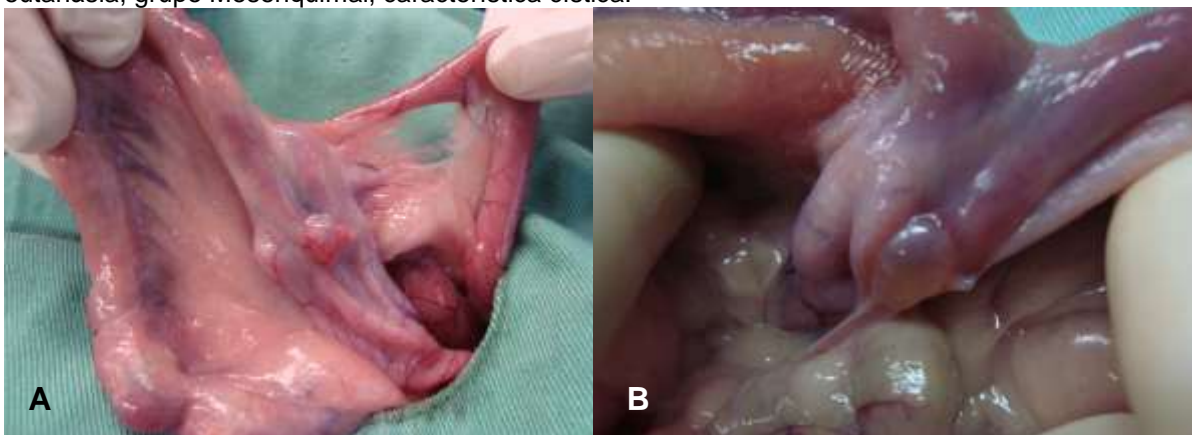
Com relação à inspeção da cavidade abdominal e dos implantes, os três grupos mostraram diferenças.

O grupo Controle, em que apenas foi realizada a exérese de um fragmento de um dos cornos uterinos, durante a segunda laparotomia (no momento da eutanásia) observou-se pouca formação de aderências.

No grupo Endometriose, em que foi realizada a implantação do retalho do fragmento uterino na região retrocervical, foi notada a presença de maiores aderências na cavidade e em relação aos implantes, três deles apresentavam a característica cística e seis característica sólida (Figura 11 A).

Já no grupo Mesenquimal, que além dos implantes, também recebeu a aplicação de 2×10^6 de células mesenquimais (peri-lesional), foi notada a presença de uma maior quantidade de aderências, inclusive dificultando o encontro dos implantes. E dentre esses, quatro apresentaram característica cística e cinco, sólida (Figura 11 B).

Figura 11. (A) Implante após eutanásia, grupo Endometriose, característica sólida. (B) Implante após eutanásia, grupo Mesenquimal, característica cística.



Fonte: a autora, 2012.

4.6 COMPARAÇÃO HISTOLÓGICA DOS IMPLANTES

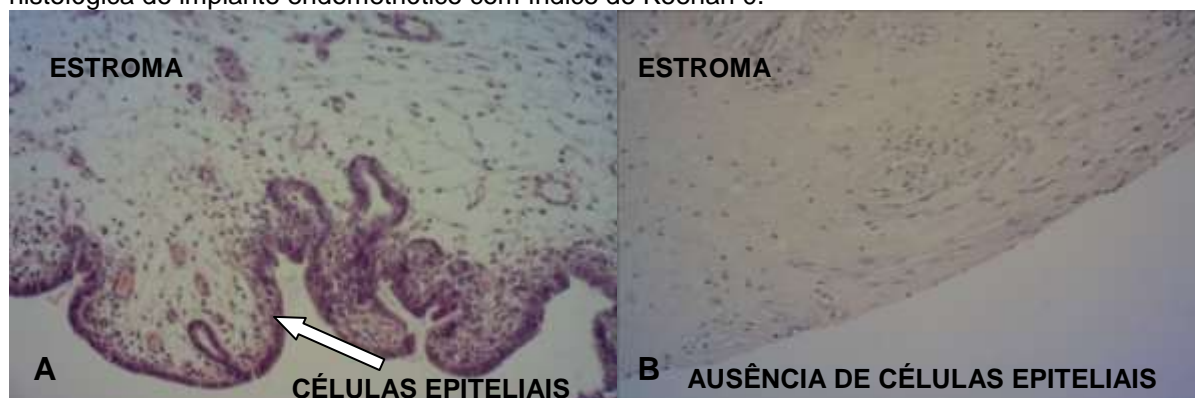
Os implantes endometriais fixados em formalina foram preparados em blocos de parafina, seccionados em uma espessura de $5\mu\text{m}$ (4 cortes por amostra), corados com hematoxilina e eosina e avaliados com microscópio ótico.

A persistência de células epiteliais nos implantes endometrióticos foi avaliada semiquantitativamente, através do índice de Keenan (KEENAN 1997). Esta classificação é dada da seguinte forma: escore 3: camada epitelial bem preservada, escore 2: epitélio moderadamente preservado com infiltrado leucocitário, escore 1:

epitélio mal preservado (apenas células epiteliais ocasionais), escore 0: nenhum epitélio.

Nas figuras abaixo se observam as imagens histológicas dos implantes retirados, com Índice de Keenan 3 (Figura 12 A) e Índice de Keenan 0 (Figura 12 B).

Figura 12. (A) Imagem histológica do implante endometriótico com índice de Keenan 3. (B) Imagem histológica do implante endometriótico com índice de Keenan 0.



Fonte: a autora, 2012.

Como resultado, observamos que no grupo Endometriose, das nove coelhas analisadas, três apresentaram Índice de Keenan 0 (33,33%) e seis, Índice de Keenan 3 (66,67%). Já no grupo Mesenquimal, duas apresentaram Índice de Keenan 0 (22,22%) e sete, Índice de Keenan 3 (77,78%).

Testou-se a hipótese nula de que os resultados de Keenan são iguais nos dois grupos versus a hipótese alternativa de que os resultados são diferentes. Os seguintes resultados foram obtidos: grupo Endometriose com mediana de 3 e desvio-padrão de 1,5; grupo Mesenquimal mediana de 3 e desvio padrão de 1,3. A comparação teve um valor de $p=0,730$. Na tabela 6 são apresentadas estatísticas descritivas da variável Keenan de acordo com os grupos e o valor de p do teste estatístico.

Tabela 6. Comparação do Índice de Keenan nos grupos Endometriose e mesenquimal, respectivamente; $p<0,730$.

Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Valor de p
Grupo E	9	0	3	3	$2\pm 1,5$	0,730
Grupo M	9	0	3	3	$2,3\pm 1,3$	

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

Fonte: a autora, 2013.

5 DISCUSSÃO

Esse trabalho se propôs a avaliar o efeito das células mesenquimais em coelhas expostas a endometriose.

A escolha de coelhas como modelo experimental foi baseada no fato de que estes animais mostraram-se eficazes no desenvolvimento de focos de endométrio ectópico na parede abdominal, mantendo características evolutivas que sugerem progressão da lesão ao longo do tempo e viabilidade do tecido implantado (ROSA E SILVA e NOGUEIRA, 2004).

Nesse estudo, buscou-se fazer a mesma técnica utilizada para o implante na parede abdominal (ROSA E SILVA e NOGUEIRA, 2004), excetuando-se pelo fato de realizar o implante endometriótico na região posterior do colo do útero do animal e não superficial, pois a localização profunda é tida como mais frequentemente envolvida com a infertilidade (COUTINHO *et al*, 2008).

Várias teorias têm sido propostas para explicar a endometriose. Sua etiologia ainda está distante de ser explicada, embora inúmeros trabalhos tenham sido realizados nas últimas décadas (IHLENFELD *et al*, 2005; ABRÃO *et al*, 2007 b). Portanto, não existe até o momento, uma teoria única que identifique e explique todos os aspectos clínicos dessa doença considerada multifatorial (KAMERGORODSKY *et al*, 2007).

Sabe-se que na endometriose há produção de várias citocinas, que são fatores solúveis com funções imunorreguladora, ativadora ou supressora, que acabam de um modo geral estimulando a proliferação endometrial e contribuem para a produção de proteínas de fase aguda de inflamação, criando um ambiente pró-inflamatório (IHLENFELD *et al*, 2005). Sabe-se também que as células endometriais, no contexto da endometriose, mostram características de expansão e de cronicidade, no sentido em que apresentam capacidade de migração, de invasão e de resistência a apoptose (ABRÃO *et al*, 2007b).

Nesse cenário é que entram as novas teorias que exploram a participação do sistema imunológico, seja por ser facilitador do desenvolvimento da endometriose, seja por ser ativado por ela (ABRÃO *et al*, 2007b); assim como a participação das células-tronco, principalmente da linhagem mesenquimal, na origem da doença (GARGETT, 2004; CHAN *et al*, 2004).

As células mesenquimais apresentam baixa imunogenicidade e propriedade imunomoduladora (LI *et al*, 2012). Essa capacidade imunossupressora só existe quando essas células estão expostas a níveis suficientemente altos de citocinas pró-inflamatórias (LI *et al*, 2012; de MIGUEL *et al*, 2012; SHI *et al*, 2010).

Os fatores secretados pelas células mesenquimais têm propriedades tróficas, imunomoduladoras, anti-apoptóticas e angiogênicas. Nesse sentido, essas células têm aplicação em doenças inflamatórias (doença de Chron, doença do enxerto *versus* hospedeiro), no infarto do miocárdio e no transplante de órgãos sólidos (DOORN *et al*, 2012). O papel imunomodulador das células mesenquimais é uma das questões importantes hoje em dia, pois este aspecto pode ser aplicado inclusive na busca de uma vacina para doenças auto-imunes (SOLEYMANINEJADIAN *et al*, 2012).

O aspecto regenerativo/reparador das células mesenquimais está na sua capacidade de diferenciação em tecidos especializados e da sua auto-renovação, amplamente utilizados no infarto do miocárdio (DOORN *et al*, 2012).

Pode-se dizer, então, que hoje, as principais aplicações das células mesenquimais estão no reparo tecidual (propriedade regenerativa/ diferenciação), nas doenças auto-imunes e na prevenção da doença do enxerto *versus* hospedeiro (propriedade imunológica) (MUNDRA *et al*, 2013).

Desde 2004, o grupo de pesquisa de Gargett comprovou a presença de células-tronco no endométrio humano (CHAN *et al*, 2004) e sua correlação com a regeneração cíclica do endométrio (GARGETT, 2004; CHAN *et al*, 2004; DU e TAYLOR, 2009) e, apesar de necessitar de maiores investigações, o sistema reprodutor humano é considerado como uma fonte valiosa de células-tronco, especificamente, da linhagem mesenquimal (BIEBACK *et al*, 2012).

As células mesenquimais derivadas da medula óssea também contribuem para o crescimento do endométrio e para sua regeneração e desempenham algum papel na progressão da endometriose (VIDANE *et al*, 2013).

Ligação importante que existe entre as células mesenquimais e a endometriose é a descoberta de que a transição epitélio-mesenquima, que é um processo que consiste em uma série de mudanças no fenótipo de células epiteliais e que fazem com que estas assumam características de células mesenquimais, como ter maior capacidade de migração, de invasão e de resistência a apoptose, pode estar envolvida na fisiopatogenia da endometriose (POPPE, 2013; MATSUZAKI e

DARCHA, 2014), uma vez que as células endometrióticas, no contexto da endometriose também assumem esta função (GOMES *et al*, 2011).

Dessa forma, pode-se criar um paralelo entre as três entidades (células mesenquimais, endometriose e transição epitélio-mesenquimal), vista a semelhança entre as características das mesmas.

Partindo então dessa “interação” existente entre as células mesenquimais a endometriose, avaliou-se qual o efeito de uma sobre a outra.

Devido a sua baixa imunogenicidade as células mesenquimais são adequadas para ambos os transplantes autólogos e alogênicos. A partir de seu isolamento (da medula óssea, do tecido adiposo, do cordão umbilical, da placenta, etc) e da posterior expansão *in vitro* (cultivo celular), o transplante (autólogo ou alogênico) pode ser aplicado via infusão sistêmica ou infusão local (DE MIGUEL *et al*, 2012). Este último método, ao contrário da infusão sistêmica, não permite o “aprisionamento” das células no fígado, nos pulmões e no baço e nos garante saber que a quantidade exata do volume aplicado de células atingiu o local desejado (MUNDRA *et al*, 2013) que, em nosso trabalho, foi no implante endometrial criado.

O volume celular a ser infundido em cada coelha foi baseado em três estudos prévios, o qual um deles se utilizou da concentração de 1×10^6 da fração mononuclear autóloga da medula óssea para o tratamento local de lesão do nervo tibial em coelhos (COLOMÉ *et al*, 2008), um segundo que utilizou a concentração de 1×10^5 de célula mesenquimais da medula óssea para o tratamento local de lesões tendíneas (SOUZA *et al*, 2012). Em contra-partida, no ano de 2013, o estudo de Mambelli e colaboradores, utilizou-se da concentração de 2×10^7 de células mesenquimais, para o tratamento da endometriose em éguas (doença degenerativa que causa alteração das glândulas uterinas - com diferenciação atípica - e do estroma endometrial diretamente relacionada a infertilidade em equinos), porém, pela via intra-uterina, através da inseminação direta (MAMBELLI *et al*, 2013). Não encontramos na literatura experimentos específicos com células mesenquimais aplicadas localmente em coelhas com endometriose.

Baseado nesses parâmetros, decidiu-se pela concentração de 2×10^6 para a infusão local em cada implante.

A medula óssea foi utilizada como fonte de células mesenquimais, pois entre todos os tecidos que apresentam esse tipo celular após a vida pós-natal, ela foi a mais estudada, por muitos anos, como fonte tanto de células-tronco

hematopoiéticas, quanto de células-tronco não-hematopoiéticas (CAPLAN, 1991). Além disso, a extração celular da medula óssea foi de fácil manejo, sendo necessária a exérese dos ossos longos de duas coelhas com posterior lavagem do seu interior com solução fisiológica 0,9% mais um meio de cultura para a obtenção do pool celular.

As células mesenquimais foram identificadas, através de dois critérios oriundos da Sociedade Internacional de Terapia Celular (MUNDRA *et al*, 2013): células que se proliferam *in vitro* e que são aderentes ao plástico. O terceiro critério não foi aplicado (citometria de fluxo com positividade para CD15, CD 73 e CD90 e negatividade para CD34, CD16, CD45, CD11a e HLADR), pois ainda não há um painel de citometria de fluxo específico para identificação celular de coelhos no Laboratório de Terapia Celular da PUCPR, sendo este trabalho pioneiro para o laboratório. Não fala-se em células-tronco mesenquimais, apenas células mesenquimais, pois não foi realizada a caracterização das mesmas através da diferenciação em outras linhagens celulares.

Após a aplicação das células mesenquimais, no volume de 2×10^6 , em cada implante endometrial criado e implantado na região retrocervical das coelhas pudemos retratar a taxa de fertilidade nos três grupos estudados: Controle, Endometriose e Mesenquimal.

O grupo Controle e o grupo Endometriose apresentaram a mesma taxa de fertilidade, ou seja, das nove coelhas presentes em cada grupo, sete ficaram prenhes. Já o grupo Mesenquimal teve uma taxa de fertilidade de apenas uma prenhe entre os nove animais do grupo. Através desses dados, pode-se notar a baixa taxa de fertilidade do grupo Mesenquimal.

Comparando, portanto, o grupo Controle com o grupo Endometriose, não houve diferença estatística (valor de $p=1$), ou seja, a doença não piorou a taxa de fertilidade. Isso mostrou que as coelhas não foram um bom modelo de infertilidade relacionada à endometriose.

A ausência de diferença na taxa de fertilidade nos dois grupos (Controle e Endometriose), inclusive com a alta taxa de fertilidade apresentada até mesmo nos animais em que a doença (endometriose) foi reproduzida, foi o contrário do que é encontrado na literatura, onde temos que a endometriose é uma entidade que leva à infertilidade (NÁUL e SPRITZER, 2010; PANDOLFI *et al*, 2000).

O fato da endometriose não ter gerado infertilidade pode ter várias explicações. Sabe-se que o tempo necessário para gerar a doença, ou seja, para o endométrio implantado se tornar secretor, é, em ratas, de 21 dias (SCHOR *et al*, 1999; BUDDEL, 2011). Talvez em coelhas esse período de tempo não seja o mesmo, sendo que os implantes poderiam não estar ativos no período das cópulas.

Também se indaga se a forma em que a doença foi reproduzida (retrocervical-profunda) foi a ideal para gerar a infertilidade. Sabemos que, em humanas, a forma profunda é a principalmente relacionada à infertilidade (COUTINHO *et al*, 2008, CARNEIRO *et al*, 2013), mas talvez esse fato pode não ser extrapolado para coelhas.

Os motivos associados entre a endometriose e infertilidade ainda não estão completamente estabelecidos. Distorções anatômicas e aderências pélvicas atrapalham a função tubária. Porém pacientes com alterações mínimas da anatomia também podem ter a fertilidade prejudicada. Essa ocorrência pode estar correlacionada com a diminuição do desenvolvimento oocitário, da embriogênese e da implantação embrionária, devido à alteração do ambiente peritoneal propiciado pelo aspecto inflamatório da doença (D'HOOGE *et al*, 2003). Disso se questiona se forma peritoneal apresentaria o mesmo resultado.

Já comparando os grupos Controle e o Endometriose com o grupo Mesenquimal pode-se notar que houve diferença estatística entre os grupos (valor de $p=0,015$ para ambas as comparações). Isso foi devido à baixa taxa de fertilidade encontrada do grupo Mesenquimal.

Um dos mecanismos auxiliam a entender tal fato está na fisiopatologia da doença. A comprovação de células-tronco no endométrio humano (CHAN *et al*, 2004), especificamente da linhagem mesenquimal (BIEBACK *et al*, 2012) pode estar relacionado à piora da taxa de fertilidade no grupo que recebeu células mesenquimais, uma vez que usamos células que podem estar envolvidas na origem e progressão da doença.

Outro mecanismo que pode estar envolvido é a transição epitélio-mesênquima (processo que consiste em uma série de mudanças no fenótipo de células epiteliais e que fazem com que estas assumam características de células mesenquimais como ter maior capacidade de migração, de invasão e de resistência a apoptose) (POPPE, 2013; MATSUZAKI e DARCHA, 2014), uma vez que as células

endometrióticas, no contexto da endometriose também assumem esta função ABRÃO *et al*, 2007b), tendo assim uma soma de efeitos das duas entidades.

Contudo, olhando por outro ponto de vista, interpela-se que o tempo a mais que esse grupo foi submetido (21 dias para o desenvolvimento da doença mais 21 dias para padronizar o tempo de pós-operatório entre os três grupos = 42 dias) pôde ter influenciado no resultado. Esse período a mais que os implantes foram expostos pode ter levado a deteriorização dos mesmos. Solução interessante seria padronizar os três grupos com o mesmo período de tempo para o início das cópulas (42 dias) ao invés do tempo maior ficar apenas com o grupo mesenquimal.

Observação importante foi o tempo que cada grupo levou para entrar em seu período fértil. Como já descrito nos métodos, a coloração avermelhada/ violácea das vulvas das coelhas forneceu o indício do início do período fértil de cada animal (BISHOP, 2002; PTASZYNSKA, 2007) e as avaliações vulvares foram iniciadas nos grupos Controle e Endometriose após 21 dias da realização do implante de endometriose, tempo necessário para o desenvolvimento da doença no segundo grupo (SCHOR *et al*, 199; BUDEL, 2011), e 21 dias após a aplicação das células mesenquimais no grupo Mesenquimal, para a padronização nos três grupos (mesmo tempo de pós-operatório para início das cópulas).

Analisando então os três grupos, constatou-se que o grupo Mesenquimal foi o que levou o maior tempo para iniciar seu período fértil (mediana de 40 dias) e o grupo Endometriose foi o que mais rapidamente entrou nesse período (mediana de 14 dias). Podemos observar que houve diferença estatística entre os grupos (com valor de $p=0,005$). Verificando o comportamento da fertilidade de cada animal dentro do seu próprio grupo, as coelhas do grupo Controle tiveram uma relativa dispersão, sendo o grupo mais heterogêneo; já as dos grupos Endometriose e Mesenquimal foram mais homogêneas quando comparadas ao Controle.

Comparando os grupos dois a dois, não houve diferença estatística entre o Controle e o Endometriose, ou seja, a doença não atrapalhou a entrada no período fértil. Já a comparação do grupo Mesenquimal com os demais apresentou diferença estatística, mostrando que esse grupo levou um tempo maior para entrar no período fértil, destoando dos demais.

A demora em entrar no período fértil do grupo Mesenquimal pode ser questionada pelos mecanismos discutidos acima: a soma dos efeitos das células mesenquimais na origem e progressão da endometriose (no sentido então de

“facilitar” a doença) ou pelo fato do tempo maior que esses animais ficaram expostos aos implantes (42 dias e não 21 dias como os demais grupos).

Analisaram-se então os desfechos obstétricos nos três grupos. Foi notado que no grupo Controle, das sete gestações ocorridas, houve dois desfechos satisfatórios (nascidos vivos) e cinco desfechos insatisfatórios (abortamentos e óbitos fetais). Já no grupo Endometriose, das sete gestações ocorridas, houve cinco desfechos satisfatórios (nascidos vivos) e dois desfechos insatisfatórios (abortamentos e óbitos fetais). O grupo mesenquimal teve apenas uma gestação e esta resultou em óbito fetal.

Apesar de haver cinco nascidos vivos no grupo Endometriose (desfechos satisfatórios) e apenas dois no grupo Controle, essa diferença não foi estatística. Essa ocorrência pode ter sido ocasionada devido ao tamanho reduzido da amostra. Analisando os dados isolados, chamou-se a atenção o fato do grupo Endometriose ter mais nascidos vivos que o Controle. Isso contraria a literatura que mostra a endometriose relacionada com aumento das chances de abortamento, óbito fetal e parto prematuro (MAFRA *et al*, 2008).

Avaliando então os implantes realizados, pode-se observar diferenças entre os dois grupos em que os mesmos foram criados (Endometriose e Mesenquimal).

No grupo Endometriose os implantes foram medidos, analisados e retirados após a eutanásia dos animais, a qual se realizou após a ocorrência dos eventos obstétricos (abortamentos ou nascimentos) ou após a data provável de parto, que é de 30 a 33 dias após a cópula- tempo médio da duração de gestação em coelhas (BISHOP, 2002; PTASZYNSKA, 2007) ter se passado e os filhotes não terem nascido (óbito fetal). Já no grupo Mesenquimal, os implantes foram medidos e analisados no momento da segunda cirurgia (aplicação das células mesenquimais) no qual todos foram considerados viáveis (superfície $\geq 25\text{mm}^2$) e novamente medidos, analisados e então retirados após a eutanásia dos animais, a qual se realizou após ter passado a data provável de parto não haver nascimentos (óbito fetal).

A diferença do tamanho da superfície do implante (final-inicial) foi verificada nos dois grupos. Como explicitado nos métodos, a área inicial de todos os implantes era de 25mm^2 . O grupo Endometriose teve uma média de $55,1\text{mm}^2$ na diferença e o grupo Mesenquimal teve uma média de $82,7\text{mm}^2$. Apesar da diferença aparente, aplicando a mediana, percebemos que a mesma foi de 55mm^2 para ambos,

corroborando isto, temos que o valor de p foi de 0,83, ou seja, sem diferença estatística.

O grupo Mesenquimal teve um maior desvio-padrão, pois apresentou um animal que teve sua área de implante muito aumentada, em comparação aos demais, o que elevou a média do grupo, porém o mesmo não foi excluído das análises estatísticas porque não foi um *outline*, permanecendo dentro da amplitude de dispersão do gráfico boxplot. Notou-se então que as células mesenquimais não alteraram o crescimento dos implantes endometriais, em comparação ao grupo em que não foram aplicadas.

A avaliação macroscópica da cavidade pélvica, no momento da eutanásia de cada animal, mostrou que no grupo Endometriose houve maior presença de aderências em comparação com o grupo Controle e, que no Grupo Mesenquimal, as aderências foram ainda maiores, em comparação com ambos os grupos. Isso está de acordo com a literatura, em que estudos de ressonância magnética e avaliações cirúrgicas mostram a presença de aderências nas pacientes avaliadas com a endometriose profunda (COUTINHO *et al*, 2008; KAMERGORODSKY *et al*, 2008).

No grupo Mesenquimal houve grande dificuldade em se identificar e em se retirar os implantes, devido à grande aderência presente. Muitos dos implantes desse grupo foram encontrados através da presença do fio de sutura em que os mesmos foram fixados na região retrocervical.

Sabe-se que a distorção anatômica e as aderências são alguns dos mecanismos que geram infertilidade, no contexto da endometriose (D'HOOGHE *et al*, 2003; GUPTA *et al*, 2008). Nessa situação, o grupo que recebeu células mesenquimais sobre os implantes endometrióticos, por apresentar maior aderência pélvica, pode ter sua baixa taxa de fertilidade explicada por esse mecanismo. Comprovação melhor para esse fato seria, como já dito acima, a verificação da presença das células mesenquimais nos implantes.

A avaliação macroscópica das lesões, também realizada no momento da eutanásia de cada animal, evidenciou que no grupo Endometriose três implantes tinham a aparência cística e seis aparência sólida; já os do grupo Mesenquimal quatro implantes tinham aparência cística e cinco aparência sólida.

Por fim, foi realizada a análise histológica dos implantes, utilizando o índice de Keenan. Esse índice quantifica semi-quantitativamente a persistência de células epiteliais nos implantes endometrióticos (KEENAN *et al* 1997).

Nesse estudo, nos implantes realizados, somente foram encontrados Keenan 3 e 0, ou seja, a doença completamente desenvolvida ou ausência da doença. E obteve-se uma mediana do índice de Keenan de 3 para os dois grupos, mostrando não haver diferença estatisticamente significativa no índice de Keenan entre eles.

Com essas últimas análises pode-se verificar que as células mesenquimais pioraram a taxa de fertilidade, aumentaram o tempo para se iniciar o período fértil e apresentaram maiores aderências pélvicas, mas, em contrapartida, não alteraram o tamanho e nem a histologia dos implantes. Para afirmarmos que as células mesenquimais pioraram a endometriose criada, seria necessário, antes de tudo, que o implantes também sofressem alguma alteração.

Após então a observação de todos os resultados obtidos nos três grupos, verificou-se que o grupo Mesenquimal foi o que apresentou a pior taxa de fertilidade, levou o maior tempo para entrar no período fértil, apresentou maior quantidade de aderências e trouxe maiores dificuldades na identificação e retirada dos implantes.

Com isso apesar do seu potencial imunomodulador (DOORN *et al*, 2012) as células mesenquimais aplicadas nas lesões, não “combateram” a endometriose, que é uma doença de características inflamatórias (NISOLLE e DONEZ, 1997; AMARAL *et al* 2009; KONDO *et al*, 2011).

Estes fatos podem ser explicados pelo melhor entendimento na fisiopatologia da doença, uma vez que, como dito acima, muito se tem falado na correlação da endometriose com a transição epitélio-mesenquimal (POPPE, 2013; MATSUZAKI e DARCHA, 2014), e da presença de células-tronco progenitoras no endométrio humano, especificamente da linhagem mesenquimal (BIEBACK *et al*, 2012). Dessa forma, aplicando células mesenquimais nos implantes endometrióticos pode-se ter fornecido substrato para o desenvolvimento e/ou piora da doença reproduzida.

Esses apontamentos poderiam ser certificados através da verificação da presença de marcadores células mesenquimais nos implantes do grupo que as recebeu, durante a eutanásia, e no aumento do tempo para início das cópulas nos grupos Endometriose e Controle, deixando dessa forma tanto o grupo Endometriose quanto o Mesenquimal com 42 dias de implantes criados, retirando assim o viés do tempo a mais que os implantes do grupo Mesenquimal ficaram submetidos.

6 CONCLUSÃO

Ao aplicar células mesenquimais nos implantes endometriais retrocervicais criados nas coelhas, prejudicou-se sua fertilidade, visto que a chance do animal ficar infértil com o uso das mesmas foi quatro vezes maior que o seu não uso.

Também se observou que o tempo levado para o animal entrar no período fértil foi maior, assim como foram encontradas maiores aderências pélvicas no grupo que recebeu as células mesenquimais. Em contrapartida, o tamanho do implante e a histologia do mesmo não foram alterados com a aplicação de tais células.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Com a aplicação das células mesenquimais nos implantes retrocervicais de endometriose criados em coelhas prejudicamos a fertilidade dos animais. Este achado é muito interessante, pois se explora nos dias de hoje a correlação das células mesenquimais com a origem da doença.

Estudos futuros poderiam deixar os três grupos com o mesmo tempo (em dias) para o início das cópulas para dessa forma retiramos o viés do tempo a mais que o grupo Mesenquimal ficou exposto. Por fim sugerimos a aplicação das células mesenquimais em úteros de coelhas normais (sem implantes de endometriose) para então verificarmos se o efeito dessas células em piorar a fertilidade dos animais se dá apenas sobre a endometriose criada ou se isso ocorreria independente da doença.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, M. S. *et al.* Comparison between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis. **Hum Reprod**, v. 22. n. 12, p. 3092-3097, 2007.
- ABRÃO, M. S; NEME R. M; AVERBACH, M. Endometriose se septo reto-vaginal:doença de diagnóstico e tratamento específicos. **Arq Gastroenterol**, v.40, n.3, p. 192-197, 2003.
- ABRÃO, M. S; PODGAEC, S; DIAS JÚNIOR, J. A. Endometriose, a mulher moderna e o Brasil. **Prática hospitalar**, ano IX, n. 50, p. 73-77, 2007.
- ABRÃO, M. S; PODGAEC, S; PINOTTI, J. A; de OLIVEIRA, R. M. Tumor markers in endometriosis. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 66, n. 1, p.19-22, 1999.
- ABUMAREE, M. *et al.* Immunosuppressive Properties of mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells Rev and Rep**, v. 8, p.375-392, 2012.
- AMARAL, V. F. *et al.* Desenvolvimento de modelo experimental de endometriose em ratas. **Rev. Col. Bras. Cir**, v.36, n.3, p.250-255, 2009.
- AMARAL, V. F; SANSON, L.T; SEPULCRI, R. P; Novas perspectivas do tratamento da endometriose pélvica. **Femina**, v. 34, n. 3, p.189-196, 2006.
- ANDRADE, A.Z. *et al.* Marcadores séricos de estresse oxidativo em mulheres inférteis com endometriose. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**, v.32, n. 6, p.279-285, 2010.
- BELLELIS, P; PODGAEC, S. ABRÃO, M. S. Fatores ambientais e endometriose. **Rev Assoc Med Bras**, v.54, n.4, p.456-461, 2011.
- BERTHET, J; PASQUIER, D; RACINET, C. An original modelo f experimental edometriosis em the rabbit. **J Gynecol Obstet Biol Reprod**, v.21, p.625-628, 1992.
- BIECACK, K *et al.* Mesenchymal stromal cells: science and f(r)iction. **J Mol Med**, v.90, p.773-782, 2012.
- BISHOP C, R; Reproductive Medicine of rabbits and rodents. **Vet Clin Exot Anim**, v. 5, p.507-535, 2002.
- BUDEL, L. Análise histológica do desenvolvimento de endometriose intestinal em um modelo experimental retrocervical em ratas wistar. **XIX SEMIC PUCPR**, 2011.
- BYDLOWSKI, S.P *et al.* Características bioquímicas das Células-Tronco Mesenquimais. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.31, n.1, 2009.

CAPLAN, A I. Mesenchymal stem cells. **J Orthop.Res**, v.9, n.5, p.641-60, 1991.

CARNEIRO, M. M *et al.* C. F. Clinical prediction of deeply infiltrating endometriosis before surgery: Is it feasible: A review of the literature, **BioMed Research International**, v. 2013, p.1-8, 2013.

CHAN, R. W; SCHWAB, K. E; GARGETT, C. E. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. **Biol Reprod**, v.70, n.6, p.1738-1750, 2004.

CHAPRON, C *et al.* Deeply infiltrating endometriosis: pathogenic implications of the anatomical distribution. **Hum Reprod**, v.21, n.7, p.1839-1845, 2006.

CHAPRON, C. *et al.* Operative management of deep endometriosis infiltrating the uterossacral ligaments. **J Am Assoc Gynecol Laparosc**, v. 6,n. 1, p. 31-37, 1999.

CHO, N. P. *et al.* Lifetime expression of stem cells markers in the uterine endometrium. **Fertil Steril**, v.81, n.2, p.403-407, 2004.

COBEA. Princípios Éticos na Experimentação Animal. Disponível em <www.cobea.org.br> acesso em: 20 de maio de 2012.

COLOMÉ, L. M *et al.* Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. **Ciência Rural**, v.38, n.9, p.2529-2534, 2008

COUTINHO, J. A. C. *et al.* Ressonância magnética na endometriose profunda: ensaio iconográfico. **Radiol. Brasil**, v. 41, n. 2, p. 129-134, 2008.

DE MIGUEL, M. P *et al.* Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells: Advances and Applications. **Current Molecular Medicine**, v. 12, p. 574-591, 2012.

D'HOOGE, T. M. *et al.* Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? **Semin Reprod Med**, v. 21, n. 2, p. 243-254, 2003.

DOORN, J.*et al.* Therapeutic Applications of Mesenchymal Stromal Cells: Paracrine Effects and Potential Improvements. **Tissue Engineering: part B**, v.18, n.2, p.101-115, 2012.

DU, H; TAYLOR, H. S. Stem cells and female reproduction. **Reprod Sci**, v.16, n.2, p.126-139, 2009.

ESKENAZI, B; WARNER, M. L. Epidemiology of endometriosis. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v.24, n.2, p.235-258, 1997.

EXACOUSTOS, C. *et al.* Ultrasound mapping system for the surgical management of deep infiltrating endometriosis. **Fertil Steril**, v. 102, n.1, p. 143-150, 2014

FANCCONIER, A; CHAPRON, C. Endometriosis and pelvic pain: epidemiological evidence of the relationship and implications. **Human Reprod**, v. 11, n.6, p.595-606, 2005.

FETTBACK, P. B. T. Expressão qualitativa de genes relacionados à atividade de células-tronco em mulheres inférteis com endometriose peritoneal. 86f. 2010. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da USP, 2010.

FRIEDENSTEIN, A J. *et al.* A. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. **Exp Hematol**, v. 2, p. 83-92, 1974.

GARGETT, C. E. Stem cells in gynaecology. **Aust NZJ Obstet Gynaecol**, v.44, n.5, p.380-386, 2004.

GOMES, L.R. *et al.* Epithelial mesenchymal transition: implications in câncer progression and metastasis, 2011.

GUPTA, G. *et al.* Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. **Fertil Steril**, v. 90, n. 2, p. 247-257, 2008.

HIRATA, T. *et al.* Development of an experimental model of endometriosis using mice that ubiquitously express green fluorescent protein. **Hum Reprod**, v. 20, n. 8, p. 2092-2096, 2005.

IHLENFELD, M. F. K. *et al.* Teoria imunológica da endometriose: o papel das citocinas. **Femina**, v.33, n.5, p.335-338.

JING, Z. *et al.* Rat bone marrow mesenchymal stem cells improve regeneration of thin endometrium in rat. **Fertil Steril**, v. 101, n. 2, p. 587-594.

JONES, R. C. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH), agonist (Wy-40, 972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. **Acta Endocrinol**, v. 106, n. 2, p. 282-288, 1984.

KAMERGORODSKY, G *et al.* Avaliação da classificação histológica da endometriose observada em implantes de mulheres portadoras de endometriose pélvica superficial e profunda. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.29, n. 11, p. 568-574, 2007.

KEENAN, J. A. *et al.* A. Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with the immune modulators loxoribine and levamisole. **Fertil Steril**, v. 72, n. 1, p. 135-141, 1999.

KENNEDY S. *et al.* Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. **Hum Reprod**, v. 20, n. 10, p. 2698-2704, 2005

KONDO, W *et al.* Effect of the bone marrow derived-mononuclear stem cells transplantation in the growth, VEGF-R, TNF-alpha expression of endometrial implants in Wistar rats. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.158, n.2, p.298-304, 2011.

LEBOVIC, D. I; MULLER, M.D; TAYLOR, R.N. Immunobiology of endometriosis. **Fertility and Sterility**, v.75, n.1, p.1-10, 2010.

LI, W. *et al.* Mesenchymal stem cells: a double- edge sword in regulating immune responses. **Cell Death and Differentiation**, v.19, p.1505-1513, 2012.

MAFRA, F.A. *et al.* **54° Congresso Brasileiro de genética**. Avaliação genético-clínica da determinação dos fatores de riscos para endometriose correlacionados à infertilidade em mulheres portadoras de endometriose. 2008.

MAMBELLI, L. I *et al.* A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometriosis. **Theriogenology**, v.79, p.744-750, 2013.

MARTIN, D.D; BATT, R.E. Retrocervical. Retrovaginalpouch and rectovaginal septum endometriosis. **J Am Assoc Gynecol Laparosc**, v. 8, n.1, p.12-17, 2001.

MARTIN, G; HUBERT, G; LEVY, B. Depth of the infiltration of endometriosis. **J Gynecol Surg**, v. 5, n.55, p.55-60, 1985.

MATSUZAKI, S; DARCHA, C. Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis. **Hum Reprod**, v. 27, n.3, p.712-721, 2014.

MAYACK, M. J. *et al.* Fluorescent detection of rabbits implants resulting from monodispersed viable cell suspensions. **Fertil Steril**, v.54, p.356-359,1990.

MEIRELLES, LS. *et al.* Mechanisms involved in the therapeutic proprieties of mesenchymal stem cells. **Cytokine and growth factor reviews**, v. 20. P. 419-427, 2009.

MUNDRA, V; GERLING, I. C; MAHATO, R. I. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. **Molecular pharmaceuticals**, Tenessi, v.10, p.77-89, 2013.

NÁUL, A.P; SPRITZER, P. M. Aspectos atuais do diagnóstico e tratamento da endometriose. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 32, n.6, p. 298-307, 2010.

NISOLLE, M; DONNEZ, J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. **Fertil Steril**, v.68, n.4, p.585-596, 1997.

OLIVEIRA, F.R. *et al.* Células-tronco: a resposta para os enigmas da patogênese da endometriose? **Femina**, v.38, n.6, p.263-269, 2010.

PANDOLFI, P.E. *et al.* Endometriose. **Rev HCPA**, v.20, n. 2, p.150-160, 2000.

PAIVA, F.O; MAFFILI, V.V; SANTOS, A. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Fundação Oswaldo Cruz. **Ministério da Saúde**, p. 1-28. 2005

PHINNEY, D G; SENSEBÉ, L. Mesenchymal stromal cells: misconceptions and involving concepts. **Cytotherapy**, v 14, p. 140-145, 2013.

PTASZYNSKA, M. Reprodução de coelhos. In: PTASZYNSKA, M. **Compêndio de reprodução animal**. Intervet, 2007, p. 320-323.

PODGAEC, S; ABRÃO, M. S. Endometriose: aspectos atuais do diagnóstico e tratamento. **Rev Bras Med**, v. 61, n.1/2, p. 41-46, 2004.

POPPE, A.C.P. Avaliação de marcadores relacionados à transição epitélio-mênquima na endometriose pélvica. 2013. 100f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2013.

ROSA E SILVA, J. C; NOGUEIRA, A. A. Desenvolvimento de um modelo experimental de endometriose em coelha. **RBGO**, v.26, n.6, p.495, 2004.

SAMPSON, J. A. Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts of the ovarian: their importance and especially their relation to pelvic adenomas of the endometrial type. **Arch Surg**, v.3, p.245-323, 1921.

SASSON, I. E; TAYLOR, H. S. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, v.1127, p.106-1115, 2008.

SCHOR, E. *et al.* Endometriose: modelos experimentais em ratas. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**, v. 21, n. 5, 1999.

SCHWINDT, T. T *et al.* Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 16, n. 1, p.13-16, 2005.

SHI, Y. *et al.* Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. **Cell Research**, v.20, p. 510-518, 2010.

SOLEYMANINEJADIAN, E; PRAMANIK, K; SAMADIAN, E. Immunomodulatory properties of Mesenchymal Stem Cells: Cytokines and factors. **Am J Rep Immunol**, v. 67, p. 1-8, 2012.

SOUZA, L.A. *et al.* Células-tronco mesenquimais da medula óssea de coelhos: isolamento, cultivo *in vitro* e perspectivas de utilização em lesões tendíneas. 2011.

STRATTON, P. The association of clinical symptoms with deep infiltrating endometriosis: the importance of the preoperative clinical assessment. **Hum Reprod**, v.29, n.8, p. 1627-1628, 2014.

VIDANE, A. S. *et al.* Reproductive stem cells differentiation: extracellular matrix, tissue microenvironment and growth factors direct the mesenchymal stem cell lineage commitment. **Reproductive Sciences**, v.0, n.0, p.1-7, 2012.

ZAIA, J.C.M; **Cunicultura**, p.139-144, 1990.

ANEXO – APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

PUCPR

Curitiba, 21 de junho de 2012.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 710 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Uso de células tronco mesenquimais em modelo experimental de endometriose / Infertilidade

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Jaqueline Pedroso de Abreu

EQUIPE DE PESQUISA:

Jaqueline Pedroso de Abreu

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Medicina / Medicina

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Coelho	Fêmea	6 a 8 meses / 3 a 4 kg	B	30

O colegiado do CEUA em reunião no dia 21/06/2012, 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 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.





Pontifícia Universidade Católica do Paraná
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação
 Comitê de Ética em Pesquisa

PUCPR

GRUPO MARISTA

Curitiba, 20 de Março de 2014.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 710 (Alteração de título)

TÍTULO DO PROJETO: O efeito das células mesenquimais na endometriose retrocervical em modelo experimental.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Jaqueline Pedroso de Abreu.

EQUIPE DE PESQUISA: Jaqueline Pedroso de Abreu, Vivian Ferreira do Amaral.

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Medicina / Medicina

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
<i>Alteração de título</i>				

O colegiado do CEUA em reunião no dia **20/03/2014**, 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,

Profa. Dra. Marta Luciane Fischer

Coordenadora

Comitê de Ética no Uso de Animais.

Profª Dra. Marta Luciane Fischer
 Coordenadora Comitê de Ética
 no uso de animais

