

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

ALINE GONÇALVES SAWA

Efeito da administração intrauterina de CXCL12 ou de células tronco mesenquimais nos resultados de gestação em camundongos com endometriose induzida

Ribeirão Preto

Mai 2023

ALINE GONÇALVES SAWA

Efeito da administração intrauterina de CXCL12 ou de células tronco mesenquimais nos resultados de gestação em camundongos com endometriose induzida

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Sawa, Aline Gonçalves

Efeito da administração intrauterina de CXCL12 ou de células tronco mesenquimais nos resultados de gestação em camundongos com endometriose induzida / Aline Gonçalves Sawa; Orientadora, Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva. Ribeirão Preto: FMRP, 2023. 67 p

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Versão corrigida

1. Endometriose; 2. Células estromais mesenquimais; 3. CXCL12; 4. Migração celular.

Nome: SAWA, Aline Gonçalves

Título: Efeito da administração intrauterina de CXCL12 ou de células tronco mesenquimais nos resultados de gestação em camundongos com endometriose induzida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 22/03/2023

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a.: Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

Intituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP)

Julgamento: Aprovado

Prof^o. Dr^o.: Maira da Costa Cacemiro

Intituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP)

Julgamento: Aprovado

Prof^o. Dr^o.: João Sabino Lahorgue da Cunha Filho

Intituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Julgamento: Aprovado

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e fé nesse período.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva pela oportunidade; por todo suporte, auxílio, dedicação, paciência, ensinamentos e confiança depositada em mim nesse período de crescimento científico e pessoal.

À Cleide Lúcia Araújo Silva por possibilitar o desenvolvimento da pesquisa no Laboratório de Estudos Experimentais em Animais do Hemocentro; pelo apoio e suporte sempre que necessário.

À Prof^a Dr^a Fabiola Attié de Castro e Maira da Costa Cacemiro por todo suporte e ensinamentos para o desenvolvimento de novos protocolos por nosso grupo de pesquisa.

À Adriana de Andrade Batista Murashima pelos ensinamentos e paciência no auxílio para realização da análise de imunohistoquímica do presente projeto.

À minha família por sempre me apoiar e impulsionar à realização dos meus sonhos.

À minha namorada e amigos que me deram todo suporte emocional e incentivo ao longo desse período e sempre.

Aos colegas do grupo de pesquisa do laboratório e da pós-graduação pelos momentos compartilhados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

A todos àqueles que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, meu muito obrigada!

RESUMO

SAWA, A.G. Efeito da administração intrauterina de CXCL12 ou de células tronco mesenquimais nos resultados de gestação em camundongos com endometriose induzida.

2023. Tese (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Sabe-se que mulheres com endometriose possui a fertilidade comprometida, entretanto, os mecanismos pelos quais isso ocorre são pouco esclarecidos; um dos possíveis fatores envolvidos é a implantação embrionária que parece estar prejudicada devido à baixa receptividade endometrial. Essa característica pode estar relacionada com a possível redução do tráfico de células tronco para o processo de reparo endometrial devido ao possível tráfego dessas células reparativas aos focos ectópicos da doença. Nesse contexto, a quimiocina CXCL12 e seu ligante CXCR4 criam um gradiente químico que redireciona a migração de células tronco não hematopoiéticas para o local administrado, além desta substância estar envolvida na angiogênese e reparação tecidual do local. Também como alternativa terapêutica, as células estromais mesenquimais multipotentes (CEM) injetadas localmente poderiam auxiliar nessa reparação tecidual. O presente projeto tem como objetivo avaliar o efeito da administração de CXCL12 e das CEM injetadas diretamente no útero sobre as taxas de gestação e características de placenta em camundongos subférteis com endometriose induzida em relação aos animais sham. Para isso, camundongos C57BL/6 selvagens foram submetidos a indução da endometriose cirúrgica, com sutura de fragmentos uterinos de doadora (quatro hemicornos) no peritônio parietal bilateralmente. E no grupo sham, também cirúrgico, foi realizado somente os pontos únicos de sutura sem tecido uterino. Quatro semanas depois, esses dois grupos foram subdivididos para receber um de três tratamentos: injeção intrauterina de CXCL12 ou CEM (de doadores GFP+), ou ainda placebo. As fêmeas de todos os grupos (EndoCX, EndoCEM, EndoPl, ShamCX, ShamCEM e ShamPl) foram colocadas para acasalar por até quatro semanas com machos férteis uma semana após receber o tratamento. Após serem identificadas como grávidas, estas fêmeas foram submetidas a cesárea, próxima ao termo, para coleta das placentas com fragmento uterino e cordão umbilical adjacentes. Além disso, foi coletado fragmento uterino das fêmeas que engravidaram e o corno uterino completo das fêmeas consideradas inférteis. Obteve-se como desfechos clínicos reprodutivos nos grupos ShamPl, ShamCX e ShamCEM de 100,0% de

gestação. Já no grupo EndoPI observou-se somente 50,0% de gestação, havendo recuperação das taxas de gestação nos grupos endometriose induzida tratados com CXCL12 e CEM, com taxas de gestação de 100% em ambos os grupos ($p=0,0168$). Porém, na análise de imunofluorescência não foram identificadas CEM nos complexos placenta-endométrio decidualizado dos grupos tratados com CEM. Sendo assim, é possível que as CEMs, seja por atração pelo CXCL12 ou injetadas diretamente no tecido uterino, tenham tido um efeito favorecedor do desenvolvimento placentário, porém sem participação direta na composição da mesma. Dessa forma, pode ter ocorrido secreção de substâncias locais ou desencadeamento de processos moleculares não avaliados neste estudo, como moléculas envolvidas no processo de receptividade endometrial para a implantação embrionária.

Palavras-chave: Endometriose, Células Estromais Mesenquimais Multipotentes, CXCL12, Migração celular.

ABSTRACT

SAWA, A.G. **Effect of intrauterine administration of CXCL12 or mesenchymal stem cells on pregnancy outcomes in mice with induced endometriosis**. 2023. Thesis (Master Degree in Sciences) – Graduated Program in Gynecology and Obstetrics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

It's well known that women with endometriosis have their fertility compromised, however, the mechanisms by which this occurs are unclear; one of the possible factors involved is embryonic implantation, which seems to be impaired due to low endometrial receptivity. This characteristic may be related to the possible reduction of stem cell trafficking for the endometrial repair process due to the possible traffic of these reparative cells to the ectopic foci of the disease. In this context, the chemokine CXCL12 and its ligand CXCR4 create a chemical gradient that redirects the migration of non-hematopoietic stem cells to the administered site, in addition to this substance being involved in angiogenesis and tissue repair at the site. Also as a therapeutic alternative, multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) injected locally could help in this tissue repair. This project aims to evaluate the effect of administering CXCL12 and MSCs injected directly into the uterus on pregnancy rates and placental characteristics in subfertile mice with induced endometriosis compared to sham animals. For this, wild-type C57BL/6 mice were submitted to surgical endometriosis induction, with suturing of donor uterine fragments (four hemihorns) in the parietal peritoneum bilaterally. And in the sham group, also surgical, only single suture points without uterine tissue were performed. Four weeks later, these two groups were subdivided to receive one of three treatments: intrauterine injection of CXCL12 or MSC (from GFP+ donors), or placebo. Females from all groups (EndoCX, EndoMSC, EndoPl, ShamCX, ShamMSC and ShamPl) were allowed to mate for up to four weeks with fertile males one week after receiving treatment. After being identified as pregnant, these animals were submitted to cesarean section, close to term, to collect the placentas with adjacent uterine fragment and umbilical cord. In addition, a uterine fragment was collected from females that became pregnant and the complete uterine horn from females considered infertile. Reproductive clinical outcomes were obtained in the ShamPl, ShamCX and ShamMSC groups of 100.0% pregnancy. In the EndoPl group, only 50.0% of pregnancy was observed, with recovery of pregnancy rates in the endometriosis groups treated with CXCL12 and MSC, with pregnancy rates of 100% in both groups ($p=0,0168$). However, in the immunofluorescence analysis,

MSCs were not identified in the placenta-decidualized endometrial complexes of the groups treated with MSCs. Therefore, it is possible that MSCs, whether attracted by CXCL12 or injected directly into the uterine tissue, had a favorable effect on placental development, but without direct participation in its composition. Thus, there may have been secretion of local substances or the triggering of molecular processes not evaluated in this study, such as molecules involved in the process of endometrial receptivity for embryonic implantation.

Keywords: Endometriosis, Mesenchymal Stromal Cells, CXCL12, Cell migration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho do estudo.....	29
Figura 2 – Cultivo das células estromais mesenquimais multipotentes.....	31
Figura 3 – Cirurgia de indução de endometriose.....	34
Figura 4 – Procedimento sham.....	34
Figura 5 - Cornos uterinos antes e após injeção dos tratamentos.....	36
Figura 6 – Fenotipagem da população de células estromais mesenquimais multipotentes isoladas, cultivadas e injetadas nos animais dos grupos CEM.....	46
Figura 7 – Gráfico das taxas de gestação por grupo do estudo.....	47
Figura 8 – Distribuição de peso das fêmeas grávidas no momento da cesárea.....	48
Figura 9 – Representação do processo de coleta dos complexos placenta-endométrio decidualizado.....	49
Figura 10 – Análise histomorfométrica das placentas por meio de coloração HE.....	51
Figura 11 – Marcação para GFP por imunofluorescência no complexo placenta-endométrio decidualizado nos grupos que receberam a injeção das CEMs.....	52

LISTA DE SIGLAS

α -MEM	Meio Essencial Mínimo Alfa
BSA	Albumina Sérica Bovina
CD11b	Cluster de Diferenciação 11b
CD34	Cluster de Diferenciação 34
CD31	Cluster de Diferenciação 31
CD45	Cluster de Diferenciação 45
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CEM	Célula Estromal Mesenquimal Multipotente
CXCL12	Quimiocina C-X-C com Ligante 12
CXCR4	Receptor 4 da quimiocina C-X-C
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GFP	Proteína verde fluorescente
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
LEEA	Laboratório de Estudos Experimentais em Animais
NK	Natural killer
PBS	Solução Salina Tampão de Fosfato
PE	Ficoeritrina
PL	Placebo
SCA-1	Antígeno de Célula Tronco 1
SFB	Soro Fetal Bovino
SUS	Sistema Único de Saúde
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

+	Adição
±	Mais ou menos
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
=	Igual
Σ	Somatória
<	Menor
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μm	Micrometro
cm	Centrímetro
c/	Com
CO ₂	Gás carbônico
g	Gramma
h	Hora
kg	Quilograma
M	Molar
mg	Miligrama
mm ³	Milímetro cúbico
mL	Mililitro
mm ²	Milímetro quadrado
min	Minutos
n	Número
rpm	Rotação por minuto
seg	Segundos
v/v	Porcentagem em volume
X	Veze

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
1.1. Endometriose: Sintomas e Diagnóstico.....	15
1.2. O tratamento da Endometriose.....	16
1.3. Endometriose e Células Estromais Mesenquimais Multipotentes.....	17
1.4. Endometriose e CXCL12.....	20
2. Justificativa.....	22
3. Objetivos.....	24
3.1. Objetivo primário.....	25
3.2. Objetivos secundários.....	25
4. Hipóteses.....	26
5. Material e Métodos.....	28
5.1. Animais.....	29
5.2. Desenho do estudo.....	29
5.3. Isolamento de células estromais mesenquimais multipotentes.....	30
5.4. Fenotipagem das CEM cultivadas.....	31
5.5. Indução de endometriose e sham cirúrgico.....	32
5.6. Injeção uterina dos tratamentos propostos.....	34
5.7. Acasalamento dos animais.....	36
5.8. Resolução da gestação por cesárea.....	37
5.9. Coloração com Hematoxilina e Eosina e análise histomorfométrica dos complexos placenta-endométrio decidualizado.....	37
5.10. Imunofluorescência dos complexos placenta-endométrio decidualizado dos grupos tratados com CEM (GFP positivas).....	38
5.11. Descrição dos desfechos.....	39
5.12. Cálculo amostral.....	40
5.13. Análise estatística.....	40
6. Resultados e Discussão.....	41
7. Conclusão.....	57
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS.....	64
ANEXO A – Representação da população de CEM por citometria de fluxo.....	65
ANEXO B - Aprovação para execução do projeto pelo CEUA.....	66

1. Introdução

1.1. Endometriose: Sintomas e Diagnóstico

A endometriose é uma desordem crônica inflamatória dependente de estrogênio. Ela é caracterizada pela presença de tecido endometrial glandular ou estromal fora da cavidade uterina (Giudice & Kao, 2004; Miller et al., 2017). É considerada uma doença multifatorial, possuindo fatores genéticos, endócrinos, imunológicos, microbiológicos e ambientais relacionados à sua gênese (Giudice & Kao, 2004; Senapati & Barnhart, 2011; ASRM, 2012). Essa doença acomete de 6 a 10% das mulheres em idade reprodutiva e de 35 a 50% das mulheres que apresentam infertilidade e/ou dor pélvica associadas (Senapati & Barnhart, 2011; ASRM, 2012).

O diagnóstico da doença é muito difícil, devido à heterogeneidade dos sintomas, que normalmente incluem dor pélvica intensa, dismenorreia, dispareunia, sintomas evacuatórios ou urinários pré-menstruais, sangramento menstrual intenso e irregular e infertilidade. Além disso, mulheres com endometriose possuem maior risco de desenvolver infecções, alergias, doenças autoimunes, síndromes metabólicas e ocorrência de alguns tipos de câncer, principalmente o câncer de ovário e mama (Wang et al., 2020).

Existem ainda os transtornos psicológicos, emocionais e sociais frequentemente relacionados à endometriose devido ao impacto dos sintomas associados à doença e a interferência na qualidade de vida da mulher, gerando impactos negativos na relação social e conjugal da mesma (Nácul & Spritzer, 2010).

Além disso, existem casos assintomáticos (por volta de 16 a 25% das pacientes acometidas pela doença), dificultando ainda mais o diagnóstico. Atualmente, o diagnóstico definitivo ocorre somente após laparoscopia ou videolaparoscopia seguida ou não de biópsia das lesões. Porém também são utilizados exames menos invasivos para auxiliar esse processo, como os exames físicos, laboratoriais e de imagem, sendo estes: ultrassom transvaginal, ressonância magnética e tomografia computadorizada (Kitawaki et al., 2003; Giudice & Kao, 2004).

Normalmente, o tempo até um diagnóstico definitivo é muito extenso. Estima-se que o tempo médio entre os primeiros sintomas e a confirmação do diagnóstico pode levar até oito anos e normalmente as mulheres são diagnosticadas apenas na sua terceira ou quarta década de vida. Com isso, frequentemente ocorre à progressão da doença e de seus sintomas até o início do tratamento (Giudice & Kao, 2004; Hogg & Vyas, 2015).

Estima-se que de 35 a 50% das mulheres com endometriose possuem infertilidade como um sintoma associado à doença (Bulletti et al., 2010; Stilley et al., 2012; Rosa-e-Silva et al.,

2019). Neste contexto, existem diversos mecanismos biológicos que procuram explicar essa relação, tais como anatomia pélvica distorcida, principalmente quando a doença está em fase avançada. Dessa forma, podem ocorrer anormalidades no transporte uterotubário devido a aderências locais que ocasionam alterações anatômicas na região pélvica. Além disso, ainda podem ocorrer anormalidades endócrinas, alterações no sistema de imunidade humoral e celular e foliculogênese alterada (ASRM, 2012; Fox et al., 2016; Miller et al., 2017).

Outro importante fator encontrado na relação endometriose e infertilidade, apesar de ainda controverso, é a implantação embrionária prejudicada devido à baixa receptividade endometrial apresentada por mulheres acometidas pela doença. Um estudo demonstrou que mulheres com endometriose possuíam uma expressão endometrial reduzida de $\alpha V\beta 3$ integrina durante o período de implantação embrionária. Além disso, algumas mulheres apresentaram níveis reduzidos de uma enzima envolvida na síntese do ligante endometrial com a L-seletina, proteína presente no trofoblasto embrionário (Bulletti et al., 2010). Outros estudos demonstraram que mulheres com endometriose apresentam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas envolvidas com inflamação, angiogênese e fatores de crescimento tecidual alterado no plasma e líquido peritoneal, podendo afetar a receptividade endometrial das mesmas (Stilley et al., 2012; Miller et al., 2017; Rosa-e-Silva et al., 2019).

1.2. O tratamento da Endometriose

A endometriose não possui cura, mas é controlada clinicamente para se evitar a progressão da doença. O tratamento da mesma é individualizado para cada mulher, dependendo da progressão da doença, sintomas, idade e desejo de concepção.

Para controle da doença normalmente são utilizados medicamentos como os contraceptivos orais combinados, agonista de GnRH e anti-inflamatórios não esteroidais, além do procedimento cirúrgico para retirada do tecido endometrial ectópico nos casos refratários aos tratamentos clínicos ou na tentativa de restabelecer a anatomia normal da pelve feminina geralmente nos casos de infertilidade (Giudice & Kao, 2004; Bulletti et al., 2010; Hogg & Vyas, 2015).

Em mulheres com desejo de concepção os tratamentos orais não são indicados, pois geralmente são medicações anticoncepcionais com inibição da ovulação. Além disso, comprometem o preparo do endométrio para posterior implantação embrionária e futura gestação (Nácul & Spritzer, 2010).

De acordo com estudo publicado em 2009, a ablação cirúrgica das lesões parece não

melhorar as taxas de gravidez espontânea após nove a doze meses da cirurgia excisional, e em metanálise recente o procedimento cirúrgico não melhorou a fertilidade das mulheres com endometriose (Leonardi et al., 2020). Além disso, a intervenção cirúrgica ainda apresenta taxas significativas de morbidade e complicações (Filip et al., 2020) e um número significativo de pacientes apresenta recidiva dos sintomas (Cezar & Freitas, 2009).

Dessa forma, a única alternativa para possibilitar a gestação em mulheres com endometriose e desejo de concepção é a utilização das técnicas de reprodução assistida de baixa e/ou alta complexidade, já que atualmente não existem tratamentos medicamentosos que incrementem a fertilidade natural dessas mulheres (Tomassetti & D'Hooghe, 2018).

Porém, as técnicas de reprodução assistida ainda são inacessíveis para a maioria da população, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil. Os cuidados com a infertilidade são frequentemente negligenciados pelos governos locais, sendo assim, esse serviço apresenta-se indisponível ou apenas disponível a custos muito altos para a maioria da população (Makuch et al., 2011).

Um estudo mostrou que 19 dos 25 estados nacionais não possuem atendimento para infertilidade. No país foram identificados apenas 13 centros que oferecem serviços de atenção de baixa e/ou alta complexidade na área que atendem pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Além da baixa oferta desse serviço no país, existe uma fila de espera de três meses a seis anos nos locais em que é possível se utilizar desses serviços gratuitamente ou a custos menores quando comparados a clínicas privadas de fertilização assistida (Makuch et al., 2010; 2011; 2012).

Diante do exposto, faz-se necessário a busca de novas alternativas terapêuticas medicamentosas pouco-invasivas que incrementem a fertilidade natural destas mulheres inférteis com endometriose.

1.3. Endometriose e Células Estromais Mesenquimais Multipotentes

O processo de reparo endometrial fisiológico cíclico ocorre com a participação de diversas populações celulares envolvidas na regeneração de vasos, glândulas e estroma. Para esse processo ocorre o recrutamento de células endoteliais locais provenientes de vasos sanguíneos vizinhos; células progenitoras endoteliais circulantes no sangue periférico proveniente da medula óssea; além de células estromais advindas também da medula óssea (Mints et al., 2008; Gargett et al., 2012; Zhao et al., 2015; Hufnagel et al., 2015; Pluchino & Taylor, 2016). Esses achados em modelo murino estão em consonância com os achados em humanos,

descrito por Taylor e colaboradores (2004) em que mulheres receptoras de transplante alogênico de medula óssea apresentaram células endometriais dos doadores em biópsias endometriais.

Sendo assim, pode-se sugerir que de fato as células estromais derivadas da medula óssea (ou seja, células estromais não uterinas) podem diferenciar-se em endométrio uterino humano, podendo então auxiliar no processo de regeneração desse tecido e contribuir futuramente na melhora da implantação embrionária.

Em 2005 a Sociedade Internacional de Terapia Celular introduziu o seguinte termo: células estromais mesenquimais multipotentes (do inglês multipotente mesenchymal stromal cells) para referir-se à população celular com características típicas de uma célula tronco. Dessa forma, essas células possuem características de crescimento aderentes ao plástico formando colônias, apresentam alta capacidade multipotencial *in vitro* de proliferação e diferenciação em diferentes tipos celulares, além de morfologia fibroblastoide (Lindner et al., 2010; Castro-Manreza & Montesinos, 2015).

As células estromais mesenquimais multipotentes (CEMs) são células estromais adultas de linhagem não-hematopoiética, que contribuem com a homeostase tecidual. Sendo assim, podem contribuir com a regeneração de tecidos mesenquimais, como ósseo, cartilaginoso e adiposo, além de dar suporte à hematopoiese da região (Pittenger et al., 1999). Além disso, foi descoberto que são células capazes de se diferenciarem também em diferentes tipos celulares, como neurônios, hepatócitos, cardiomiócitos e células endoteliais. Então, o emprego das CEMs é uma importante fonte de estudo para tratamento de diversas doenças, como cardíacas, neurológicas e também no sistema reprodutor feminino (Nombela-Arrieta et al., 2011).

As CEMs podem ser isoladas a partir de diversos tecidos, como músculo esquelético, tecido adiposo, sangue menstrual, cordão umbilical, tecidos fetais e mais comumente a partir da medula óssea. Porém, normalmente as CEMs estão presentes em pequenas quantidades nesses locais. Por exemplo, na medula óssea, há cerca de 0,01 a 0,001% de células mesenquimais em relação ao número total celular (Castro-Manreza & Montesinos, 2015). Dessa forma, faz-se necessário a utilização de protocolos para o isolamento e caracterização dessas células, como realizado pelo presente projeto com base nos estudos de Zhu e colaboradores (2010).

As células tronco totais e especificamente estromais mesenquimais provenientes da medula óssea podem estar relacionadas com o processo reparativo do endométrio feminino. Em 2007, Du e Taylor realizaram um transplante de células tronco totais provenientes da medula óssea de camundongos machos em fêmeas. Após o transplante, 0,1% das células do

estroma e 0,04% das células epiteliais do útero eram de origem do doador. Com isso, sugere-se a contribuição de células extra-uterinas na regeneração do endométrio ectópico. De forma análoga Tal e colaboradores (2016) demonstraram a presença de células estromais da medula óssea de camundongos transgênicos GFP positivo em 71,8% das células do estroma endometrial de camundongos não transgênicos que receberam o transplante.

De acordo com estudos anteriores, a migração de células tronco/estromais da medula para este processo reparativo parece estar comprometido na presença da endometriose (Pluchino & Taylor, 2016), e este defeito pode ser reproduzido em modelo de endometriose experimental induzida em camundongos (Sakr et al., 2014). A indução de endometriose em camundongos fêmea causou perda parcial da fertilidade destes animais, reduzindo pela metade a taxa de gravidez mensal (Rosa-e-Silva et al., 2019). Considerando-se este comprometimento na capacidade de atrair células de reparo para o útero e a redução na expressão de genes relacionados a marcadores de receptividade endometrial presentes nos indivíduos portadores de endometriose, poderia se aventar a possibilidade de que estes mecanismos estejam interligados. Sendo assim, a menor migração de células tronco/estromais impactaria na capacidade deste tecido em expressar moléculas básicas para o processo de implantação embrionária como um dos mecanismos de infertilidade ligados à endometriose (Rosa-e-Silva et al., 2019). Em contrapartida, o uso de quimioatratante nos animais com endometriose induzida, recuperou parcialmente a capacidade reprodutiva dos animais (Rosa-e-Silva et al., 2022).

Neste sentido, a infusão de células estromais mesenquimais, provenientes da medula óssea, diretamente na cavidade uterina promove melhorias histológicas no endométrio, como aumento da espessura endometrial e no número de glândulas e capilares endometriais em comparação com o grupo controle, na espécie murina. Neste mesmo estudo foi demonstrado um aumento na expressão de genes marcadores de receptividade endometrial ($\alpha V\beta 3$ integrina e LIF) no grupo transplantado, aproximando-se ao grupo controle (Zhao et al., 2015).

Hufnagel e colaboradores (2015) sugeriram a importância do tráfico celular em murinos com endometriose induzida cirurgicamente e sua correlação com a baixa receptividade endometrial dos mesmos. No estudo, camundongos selvagens sofreram endometriose induzida por meio de cornos GFP positivos, e esses animais curiosamente expressaram a proteína GFP em células endometriais na camada basal do endométrio, e não no revestimento epitelial do lúmen ou dentro das glândulas. Além disso, essas células apresentavam uma expressão aumentada de Snail1, Snail3, Goosecoid e baixa expressão de Zeb2, genes associados à transição celular epitelial à mesenquimal. Essas células, provenientes da

endometriose, iniciaram uma ativação da via de sinalização Wnt, indicando que elas possuíam características epiteliais, mas ao mesmo tempo elas não se encontravam no epitélio. Com isso, havia uma sinalização ineficiente do gradiente de moléculas de sinalização entre o epitélio e o estroma, uma atividade essencial para a receptividade endometrial murina (Pluchino & Taylor, 2016; Ojosnegros et al., 2021).

Dessa forma, sugere-se que a presença dessa população celular pode ser de grande importância para um novo potencial tratamento da relação endometriose e infertilidade devido a possível baixa receptividade endometrial ligada à doença.

1.4. Endometriose e CXCL12

O CXCL12 é uma quimiocina que possui como um de seus ligantes o CXCR4. Naturalmente, o CXCL12 é produzido em células epiteliais e estromais endometriais, e normalmente expresso em locais de inflamação e lesão, assim como ocorre em mulheres acometidas com endometriose (Hufnagel et al., 2015; Wang et al., 2015; Moridi et al., 2017). O estradiol estimula a produção de CXCL12 a partir de células estromais endometriais e de CXCR4 em células tronco derivadas da medula óssea, sugerindo um papel desta quimiocina no recrutamento de células tronco/estromais para o útero (Wang et al., 2015).

A mobilização e localização das células tronco/estromais são reguladas por quimiocinas, sendo assim, a concentração de CXCL12 cria um gradiente químico que direciona a migração de células tronco não hematopoiéticas, além de estar envolvido na angiogênese e reparação tecidual. Porém, estudos sugerem que as células estromais advindas da medula óssea podem ser atraídas para os focos de lesão de endometriose, pela via de sinalização CXCL12 e seu receptor CXCR4; dessa forma, o endométrio tópico (intrauterino) pode apresentar recrutamento reduzido dessa população celular, podendo prejudicar assim sua capacidade regenerativa local, sugerindo uma infertilidade devido à baixa receptividade endometrial local (Sakr et al., 2014, Wang et al., 2015).

Estudo de Koo e colaboradores (2021) demonstrou que o CXCL12 auxilia na angiogênese endometrial por meio da contribuição na formação de células endoteliais microvasculares do endométrio murino, por exemplo. Além disso, está relacionada com a ativação de sinalização intra e intercelular da quimiocina e seus receptores, auxiliando na relação embrião-endométrio durante a implantação embrionária.

Um estudo previamente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa demonstrou que o uso do CXCL12 em camundongos subférteis com endometriose induzida promoveu aumento das

taxas de gestação nos animais doentes, de 50% para 78%, aproximando a capacidade reprodutiva destes animais à do grupo controle sem endometriose (Rosa-e-Silva et al., 2022). Porém, o mecanismo pelo qual esta melhora ocorreu não está completamente elucidado. Verificou-se uma melhora na expressão de marcadores de receptividade endometrial, tais como aumento na expressão de receptores de progesterona e de $\alpha V\beta 3$ integrina, porém não se sabe se por ação direta sobre o tecido endometrial ou mediado por células tronco/estromais, por exemplo. Neste mesmo estudo, os animais haviam sido transplantados com células tronco totais (incluindo as estromais mesenquimais GFP positivas), via intravenoso, antes do uso do CXCL12, porém não foram encontradas células GFP no útero das fêmeas após o parto. Para isso foram aventadas duas possibilidades, ou as células haviam tido um papel importante na decidualização do endométrio e eventualmente na composição da placenta ou houve um efeito secundário do CXCL12 diretamente sobre o tecido uterino. Este estudo pretende verificar o efeito da injeção direta de CEMs no útero pré-gestacional e verificar se há ou não participação das mesmas no desenvolvimento placentário, bem como verificar o efeito do CXCL12 sobre a estrutura da placenta.

2. Justificativa

A endometriose é uma doença que acomete de 6 a 10% das mulheres em idade reprodutiva e de 35 a 50% das mulheres que apresentam infertilidade. Acredita-se que a doença possa estar relacionada com piora da receptividade endometrial e, portanto, redução das taxas de implantação embrionária. Porém, os mecanismos envolvidos nessa relação ainda não estão bem elucidados e esclarecidos.

Acredita-se que na ocorrência da doença, os focos de tecido endometrial ectópicos direcionam as células estromais mesenquimais locais e estruturas de regeneração tecidual para si, reduzindo a migração destas células para o útero. Portanto, a regeneração do útero e sua receptividade para implantação embrionária poderia estar afetada devido a esse fator.

Nesse contexto, há estudos sugerindo que células estromais mesenquimais provenientes da medula óssea podem estar relacionadas com o processo reparativo do endométrio feminino e a utilização de células estromais mesenquimais como potencialmente promissoras no tratamento de doenças inflamatórias, como a endometriose. Além disso, é sugerida por outros estudos a importância da quimiocina CXCL12 na migração de células estromais mesenquimais para a região em que ela é administrada. Já foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa que a utilização de CXCL12 no útero de camundongos fêmeas com endometriose induzida cirurgicamente promoveu aumento na taxa de gestação desses animais em relação ao controle, bem como o aumento na marcação imunohistoquímica de receptores de progesterona e $\alpha V\beta 3$ integrina no endométrio dos animais tratados, ambos marcadores relacionados à receptividade endometrial para implantação. Porém, não foi possível elucidar se a melhora nos resultados reprodutivos ocorreu ou não pela intermediação de células estromais mesenquimais.

Sendo assim, o presente estudo pretende verificar o efeito da injeção direta de CEMs no útero pré-gestacional e verificar se há ou não participação das mesmas no desenvolvimento placentário, bem como verificar o efeito do CXCL12 sobre as estruturas da placenta.

3. Objetivos

3.1. Objetivo primário

Avaliar o efeito da administração de células estromais mesenquimais ou de CXCL12 injetados diretamente no útero de camundongos fêmeas sobre as taxas de gestação de camundongos subférteis portadores de endometriose induzida cirurgicamente em relação ao controle.

3.2. Objetivos secundários

- Comparar a morfologia da placenta dos seis grupos estudados.
- Avaliar a presença ou não de células estromais mesenquimais no complexo placenta-endométrio decidualizado.

4. Hipótesis

- A administração de células estromais mensenquimais ou de CXCL12 isoladamente no útero dos animais dos grupos com endometriose induzida terá efeito benéfico nos desfechos reprodutivos.
- Existirão CEMs na estrutura da placenta no grupo que recebeu a injeção uterina dessas células como tratamento.

5. Material e Métodos

5.1. Animais

Como modelo experimental foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) selvagens da linhagem C57BL/6 e C57BL/6 transgênicos (GFP positivos) de seis a oito semanas de vida. Os animais foram ambientados no Laboratório de Estudos Experimentais em Animais (LEEA) – Hemocentro de Ribeirão Preto. Eles foram distribuídos em gaiolas adequadas (n = 4 a 5 animais/caixa), com acesso a água e ração *ad libitum*. Houve controle ambiental, com ciclo de claro e escuro de 12 horas cada (06h00 – 18h00), temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Todos os animais foram tratados seguindo os protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMRP-USP (Anexo B).

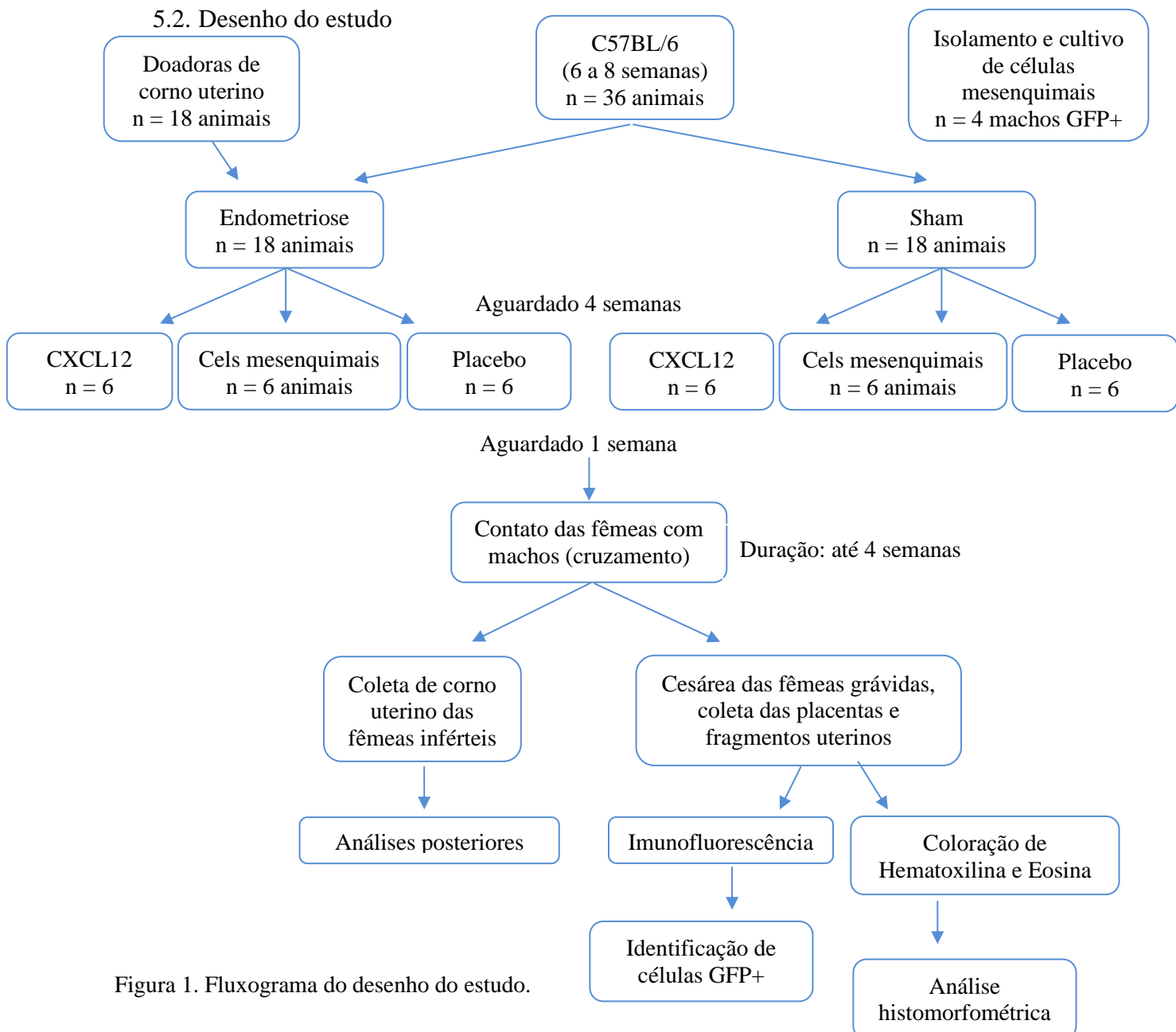


Figura 1. Fluxograma do desenho do estudo.

5.3. Isolamento de células estromais mesenquimais multipotentes

Para o isolamento foi utilizado o protocolo descrito por Zhu e colaboradores (2010). Para isso, camundongos machos da linhagem C57BL/6 transgênicos (GFP positivos; n = 4) foram eutanasiados com sobredose de anestésico Ketamina (90-120 mg/kg – Fort Dodge Animal Health) e Xilazina (5-10 mg/kg - Lioyd Laboratories) via intraperitoneal, seguido por deslocamento cervical e lavados livremente em etanol 70% (v/v).

Em seguida, foi realizada uma incisão na pele da região inguinal do animal, desassociando os músculos, separando os fêmures abaixo da cabeça femoral e desconectando os membros posteriores do tronco. Após isso, os úmeros foram dissecados, excisando a pata dianteira dos axilares.

Então, foi realizada dissecação dos músculos e tendões de úmeros, tíbias e fêmures para remoção de todo o tecido mole aderido ao osso. Após isso, as epífises foram removidas e a cavidade medular lavada com PBS 1X (Gibco) até os ossos se tornarem pálidos. Em seguida, os ossos foram fragmentados em lascas de 1 a 3 mm³. Os mesmos foram digeridos em 2 mL de α -MEM + 1 mg/mL colagenase II + 20% SFB (v/v) por 1 a 2 horas em shaker (200 rpm).

Após a digestão em colagenase, os fragmentos ósseos foram semeados em garrafa de cultura na presença de 5 mL de α -MEM + 20% SFB (v/v) e incubados (5% CO₂ a 37°C) por 3 dias. Nesse período as células mesenquimais migram da região medular óssea para a garrafa (Figura 2.A e 2.B). Em seguida, o meio de cultura foi completamente removido e substituído por novo. Após 5 dias foi realizado o mesmo processo. Em seguida, o mesmo procedimento a cada dois dias até atingir confluência de crescimento de 80% de células na superfície da garrafa.

Após confluência celular ideal (Figura 2.C e 2.D) foi realizada a tripsinização do cultivo. Para isso, foi retirado todo sobrenadante e adicionado 3 mL de tripsina 0,25% 10X c/ EDTA, incubado por 2 min (5% CO₂ a 37°C) e então adicionado 3 mL de α -MEM + 5% SFB (v/v). Após isso, as células (agora no sobrenadante – Figura 2.E) foram transferidas para um tubo cônico Falcon 15 mL e centrifugadas a 1200 rpm por 5 min. O sobrenadante foi retirado, e as células ressuspensas em α -MEM + 20% SFB (v/v). Em seguida, foi realizada a contagem das células mesenquimais arredondadas e refringentes em câmara de Neubauer, após coloração em azul de tripan 0,4% (Figura 2.F), um corante vital de tecidos e células.

Uma parte das células cultivadas foi utilizada para o tratamento dos grupos experimentais e outra parte das células sob as mesmas condições de cultivo foram identificadas por fenotipagem em citometria de fluxo. As células foram consideradas ideais para a utilização no

estudo na passagem cinco, ou seja, após cinco tripsinizações e replaqueamentos.

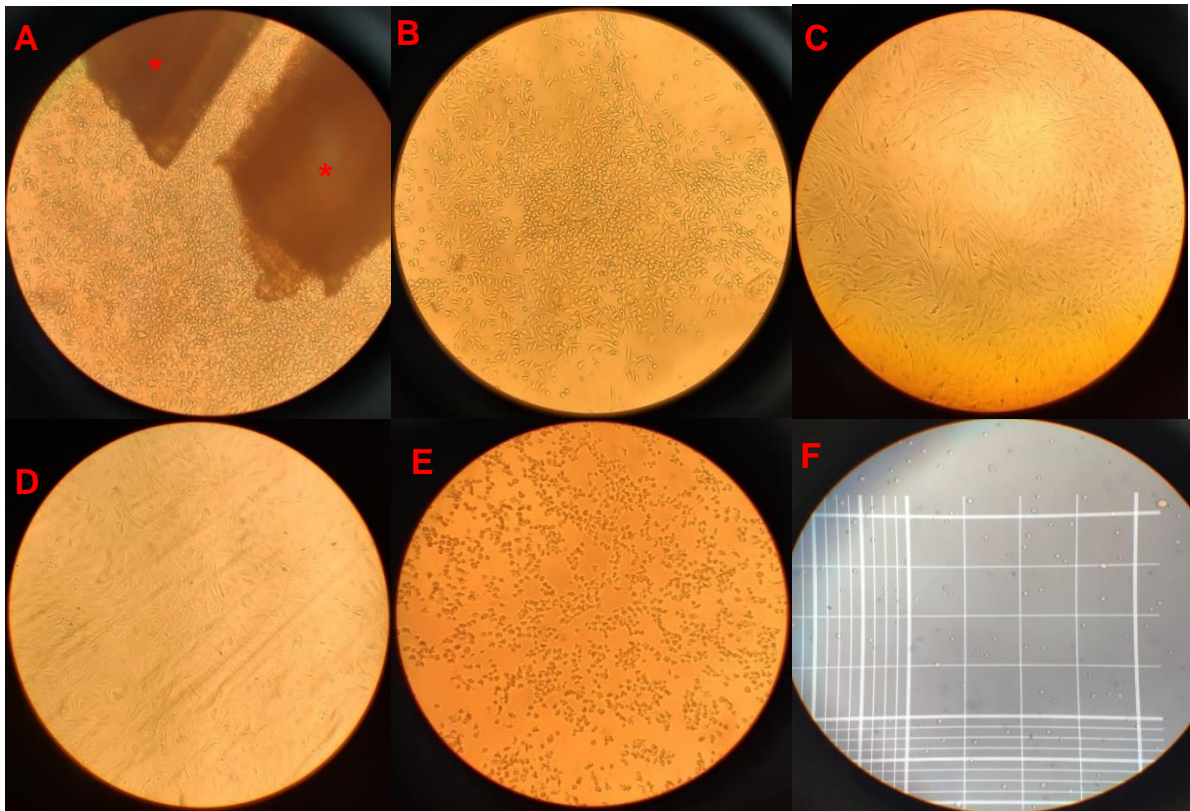


Figura 2. Cultivo das células estromais mesenquimais.

Legenda: A) Células mesenquimais em cultura migrando da medula óssea para a superfície da garrafa de cultura (aumento 10X) (* = fragmento de ossos longos). B) Células mesenquimais em passagem 1 (primeiro plaqueamento) aderidas à garrafa (aumento 10X). C, D) Células mesenquimais em passagem cinco com confluência de aproximadamente 80% (C - aumento 10X e D - aumento 40X). E) Células mesenquimais tripsinizadas, livres no meio de cultura, não aderidas à garrafa. F) Contagem das células mesenquimais em câmara de Neubauer, após coloração com azul de tripan 4%, evidenciando praticamente 100% de células viáveis (refringentes). Fonte: imagens autorais.

5.4. Fenotipagem das CEM cultivadas

As células estromais mesenquimais em passagem cinco do cultivo, condição em que foram injetadas no útero, foram submetidas a fenotipagem, por meio de citometria de fluxo (BD FACsCanto). A fenotipagem para reconhecimento da característica mesenquimal das células foi realizada por meio da identificação dos seguintes marcadores: SCA-1-PE, CD11b-PE, CD34-PE, CD31-PE e CD45-PE (todos BD-Pharmingen), além de um tubo sem marcação e um tubo com o isótopo controle ficoeritrina (PE, do inglês phycoerythrin).

Tabela 1 – Identificação dos marcadores de superfície celular utilizados na fenotipagem das células estromais mesenquimais.

Anticorpo	Característica	Resultado esperado	Referência
Antígeno de células tronco 1 (SCA-1)	Marcador de células tronco	Positivo	Baustian et al., 2015
Antígeno de macrófago-1b (CD11b)	Marcador de células imunes	Negativo	Baddoo et al., 2003
Cluster de diferenciação 31 (CD31)	Marcador de células endoteliais	Negativo	Baddoo et al., 2003
Cluster de diferenciação 34 (CD34)	Marcador de células hematopoiéticas	Negativo	Sung et al., 2008
Cluster de diferenciação 45 (CD45)	Marcador de células hematopoiéticas	Negativo	Jabeen et al., 2022

Para isso, foi realizada a tripsinização das células, como descrito anteriormente (item 5.3) e o volume de solução contendo o equivalente a 1 milhão de células foi distribuído em tubos FACS, em volumes iguais. Após isso, o material foi centrifugado (1800 rpm) por 3 min e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 200 μ L de PBS estéril 1X (Gibco).

Em seguida, em cada tubo com as células estromais mesenquimais foi adicionado 3 μ L dos marcadores utilizados. Os tubos foram incubados no escuro por 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, foi acrescentado 2 mL de PBS a todos os tubos, e realizada centrifugação (1800 rpm) por 3 min novamente.

Após isso, foi retirado o sobrenadante por inversão dos tubos. As células, agora marcadas, foram ressuspensas em 200 μ L de PBS 1X e em seguida foi realizada análise por citometria de fluxo.

5.5. Indução de endometriose e sham cirúrgico

Os animais foram divididos em dois grupos: endometriose induzida (n = 18 animais) e sham (n = 18 animais), conforme descrito nos procedimentos abaixo. O protocolo de indução

de endometriose cirúrgica foi definido com base em estudos prévios do grupo de pesquisa que identificou uma quantidade e tamanho de fragmentos que ocasionaram lesões bem consolidadas de endometriose induzida em 100% dos animais operados e diminuíram significativamente a fertilidade desses animais em relação aos animais do controle cirúrgico (sham; Rosa-e-Silva et al., 2019).

Foram utilizadas fêmeas C57BL/6 como doadoras (n = 18 animais) dos cornos uterinos para viabilizar a indução de endometriose de suas respectivas receptoras. Todos os animais foram anestesiados via inalatória com indução inicial e controle de pressão de saída de Isoflurano (Virbac) 3,0% de concentração alveolar. A manutenção durante o procedimento cirúrgico foi realizada com concentração de 1,5 a 2,0% do mesmo anestésico citado anteriormente. Além disso, anterior a cirurgia e anestesia do animal, foi administrado Meloxicam 0,2% na dosagem de 5 mg/kg via subcutânea para analgesia dos animais. Após a anestesia foi realizada uma incisão laparotômica na linha média do abdômen e retirados os dois cornos uterinos das doadoras. Os animais doadores foram eutanasiados após a retirada dos cornos uterinos por meio de sobredosagem dos anestésicos Ketamina (90-120 mg/kg – Fort Dodge Animal Health) e Xilazina (5-10 mg/kg - Lioyd Laboratories).

Posteriormente, ambos cornos foram lavados em PBS, abertos longitudinalmente e transversamente divididos em dois fragmentos com 5 mm² cada. Para a indução de endometriose, as fêmeas receptoras foram também submetidas aos mesmos procedimentos analgésico e anestésico descritos anteriormente durante e antes da realização das cirurgias. Com os animais sedados, foi realizada incisão mediana de cerca de 1,5 cm, por planos (pele e músculo separadamente). Em seguida, utilizando-se Vicryl 5-0 quatro fragmentos uterinos (preparo descrito acima) foram suturados ao peritônio parietal dos camundongos fêmeas receptoras, simetricamente distribuídos na parede peritoneal, dois de cada lado, com ponto único (Figura 3.A). Posteriormente, a parede abdominal das receptoras foi fechada em dois planos, utilizando-se Vicryl 4-0. Como controle, os animais do grupo sham receberam os mesmos quatro pontos de sutura peritoneal, porém sem o tecido endometrial (Figura 4.A).

Após o procedimento cirúrgico, o processo de analgesia dos animais foi realizado por meio de Meloxicam 0,2%, na dosagem de 5 mg/kg via subcutânea, uma vez ao dia, por dois dias consecutivos, além de administração imediatamente antes da cirurgia de indução de endometriose e sham.

Quatro semanas após a cirurgia de indução de endometriose sabe-se que os animais apresentam características muito semelhantes à endometriose, como inflamação e adesão tecidual na região dos focos ectópicos da doença, como demonstrado em estudos anteriores

desenvolvidos pelo mesmo grupo de pesquisa (Figura 3.B e 3.C).

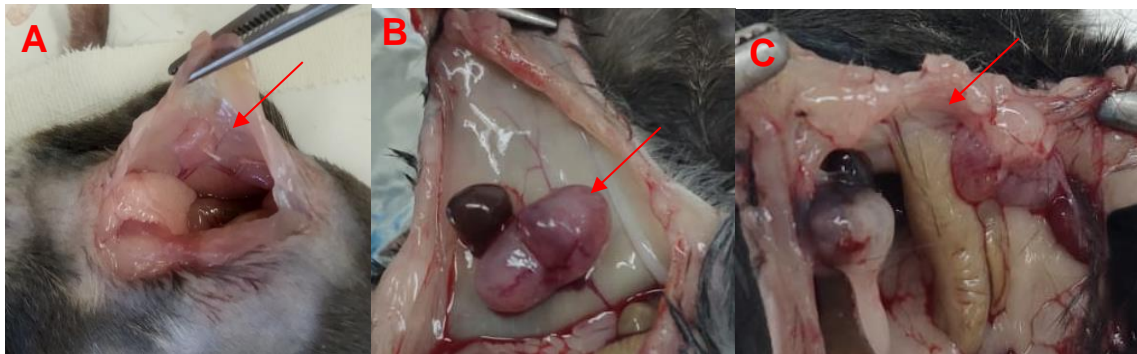


Figura 3. Cirurgia de indução de endometriose.

Legenda: A) Fragmento uterino suturado em ponto único ao peritônio parietal logo após cirurgia de indução de endometriose. B e C) Lesão de endometriose induzida no peritônio parietal após quatro semanas da indução. Fonte: imagens autorais.

Além disso, nos animais sham, é possível visualizar o ponto único de sutura com fibrose tecidual ao redor do mesmo (Figura 4.B).

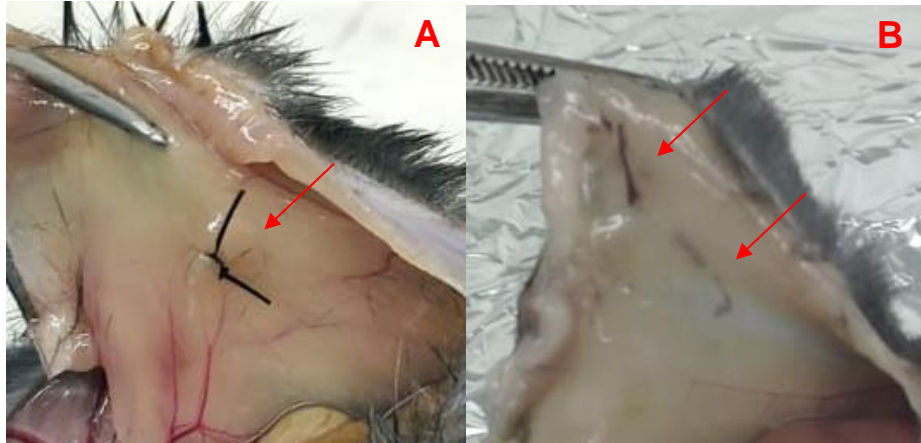


Figura 4. Procedimento sham.

Legenda: A) Ponto de sutura único no peritônio parietal, logo após cirurgia de sham. B) Procedimento sham com pequena fibrose e aderência do fio de sutura ao peritônio após quatro semanas da cirurgia.

Fonte: imagens autorais.

5.6. Injeção uterina dos tratamentos propostos

Após quatro semanas do procedimento de indução de endometriose ou sham, os animais de cada grupo foram subdivididos para receber a administração uterina de CXCL12

(Recombinant Mouse SDF-1 α , Gemini-Bio[®], West Sacraento-CA, EUA, n = 6 animais/grupo), ou de células estromais mesenquimais previamente isoladas (descrito no item 5.3., n = 6 animais/grupo) ou placebo (PBS estéril, n = 6 animais/grupo). O tempo de quatro semanas foi definido com base em estudos prévios do grupo de pesquisa que identificou a presença de lesões bem consolidadas de endometriose induzida em 100% dos animais operados após esse período (Rosa-e-Silva et al., 2019). A presença de lesão foi confirmada no intraoperatório desta segunda laparotomia.

Para a injeção uterina os animais foram anestesiados via inalatória e receberam analgesia via subcutânea como descrito anteriormente (item 5.5.). Depois de realizada incisão mediana por planos, os cornos foram expostos para a injeção de 75 μ L/corno, diretamente na parede uterina da quimiocina (CXCL12), ou células mesenquimais ou somente placebo, utilizando-se seringa e agulha de insulina (Figura 5). O volume de 75 μ L/corno foi considerado após testes realizados pelo mesmo grupo de pesquisa, considerando a variação do volume dos cornos uterinos em cada fase reprodutivas das fêmeas. Sendo assim, o volume utilizado fica completamente retido no interior dos cornos uterinos, sem extravasamento na região peritoneal, o que poderia levar a possíveis efeitos secundários inesperados e não desejados devido ao tratamento não estar concentrado na região de interesse no momento da injeção uterina.

A dose de CXCL12 administrada foi de 2,5 μ g/animal diluídos em água estéril com 0,1% BSA, com base em estudos anteriores utilizando a mesma substância em trabalhos análogos ao presente projeto, além de trabalhos anteriores do mesmo grupo de pesquisa (Rosa-e-Silva et al., 2022).

Para o grupo de células estromais mesenquimais foram injetados uma concentração de 1×10^6 de células no total, ou seja, aproximadamente 500 mil células por corno uterino. Essa concentração foi definida com base em estudos que utilizaram células mesenquimais como alternativa terapêutica, injetadas diretamente no local de ação (Chan et al., 2007; Ezquer et al., 2008; Guillot et al., 2008; Bazoobandi et al., 2020). Já para o grupo placebo foi utilizado apenas PBS estéril (diluyente das células mesenquimais). Após as injeções a parede foi suturada por planos com Vicryl 4-0.



Figura 5. Cornos uterinos antes e após injeção dos tratamentos.

Legenda: A) Cornos uterinos anteriores a injeção de um dos três tratamentos propostos. B) Cornos uterinos após injeção de um dos três tratamentos propostos. Fonte: imagens autorais.

5.7. Acasalamento dos animais

Após uma semana da administração de CXCL12, células mesenquimais ou placebo, as fêmeas dos seis grupos: endometriose + CXCL12 – (EndoCX); endometriose + células estromais mesenquimais (EndoCEM); endometriose + placebo (EndoPL); sham + CXCL12 (ShamCX); sham + células estromais mesenquimais (ShamCEM) e sham + placebo (ShamPL) foram expostas a machos férteis, previamente testados, por um período de até 4 semanas seguidas (com alternância dos machos entre as caixas semanalmente).

Para verificar a ocorrência de prenhez as fêmeas foram pesadas logo antes de serem expostas aos machos, novamente após uma semana de exposição aos machos e posteriormente a cada dois ou três dias para verificar um ganho anormal de peso o que seria sugestivo de prenhez. Fêmeas que possuíam mais de 24 g e um incremento equivalente a um grama por dia eram consideradas potencialmente grávidas e então, separadas dos machos.

As fêmeas que chegavam próximo ao peso de 28 a 30 g durante esse período foram submetidas a parto cirúrgico (cesárea) e posteriormente foram eutanasiadas com sobredose de anestésico (como descrito no item 5.5.). As fêmeas que não engravidaram durante o período de exposição aos machos, foram isoladas e observadas por um período adicional de 10 a 15 dias após o isolamento (sem contato com machos) para confirmar a não ocorrência da gestação, somente após este período foram consideradas como inférteis. As fêmeas inférteis também tiveram seus cornos uterinos coletados para análise histológica posterior.

5.8. Resolução da gestação por cesárea

As fêmeas grávidas com peso de aproximadamente (28 a 30 g) foram submetidas à analgesia e anestesia conforme descrito anteriormente (item 5.5.). Depois de confirmada a perda de consciência, foi realizada uma incisão laparotômica na linha média do abdômen e expostos os dois cornos uterinos. Em seguida, ambos cornos foram abertos na região mais distal, expondo o(s) conjunto(s) placenta/feto. Com isso, o número de placentas em cada corno uterino foi contabilizado e retirado para posterior análise em conjunto com o tecido uterino adjacente, sendo assim os fragmentos coletados apresentavam de um lado o cordão umbilical e do outro a parede uterina adjacente à placenta. Além disso, um fragmento do corno uterino sem placenta foi coletado para análise histológica posterior (Figura 9).

5.9. Coloração com Hematoxilina e Eosina e análise histomorfométrica dos complexos placenta-endométrio decidualizado

As amostras coletadas dos complexos placenta-endométrio decidualizado foram fixadas em paraformaldeído 4% (Sigma) por até 24 h em temperatura ambiente. Em seguida foi realizado o processo de desidratação do tecido com banhos seriados de 30 min cada em álcool etílico 50%, 70% e 80% (v/v) também em temperatura ambiente. Nessa última etapa o material ficou armazenado por até 1 mês a 4°C, até completar a coleta de todo o material e processamento no mesmo momento. Depois disso, o material biológico sofreu banhos seriados de 30 min cada em álcool 90% e 95% (v/v), seguido de álcool absoluto 1X, álcool absoluto 2X e álcool absoluto 3X. Em seguida, o material foi submetido a banhos seriados de 30 min cada, em: mistura em partes iguais de álcool absoluto 3X e xilol, seguido de xilol 1X, xilol 2X e xilol 3X. Posteriormente o material foi emblocado em parafina. Em seguida, foram realizados cortes com 5 µm de espessura, os quais foram montados em lâminas silanizadas. As lâminas foram codificadas por números seriados para evitar viés de interpretação no momento da leitura das mesmas.

Para a coloração, os cortes de tecido foram desparafinizados colocando as lâminas por 30 min em estufa a 60 °C, seguido de 2 banhos de xileno de 10 min cada. Para reidratação das amostras foram realizados banhos seriados de 5 min cada em álcool absoluto 2X, álcool 95%, 90%, 80%, 70% e 50% (v/v), seguido de banho em água corrente 3 vezes.

Em seguida, as lâminas foram coradas com Hematoxilina por 40 seg por imersão no corante, e então lavadas em água corrente para retirar o excesso do corante. Após isso, as

lâminas foram coradas com Eosina por 10 seg e novamente desidratadas com banhos seriados de 5 min cada em álcool etílico 50%, 70%, 80%, 90% e 95% (v/v), seguido de álcool absoluto 1X, álcool absoluto 2X e álcool absoluto 3X. Após isso, as lâminas sofreram banhos de 2 minutos cada de xilol 1X, xilol 2X e xilol 3X e foram montadas com auxílio de bálsamo do Canadá para preservação do tecido. As lâminas prontas foram lidas em microscópio de varredura (VS120 Scanner, Olympus Corporation), a qual foi realizada um escaneamento total da placenta em aumento de 10X, para análises posteriores no software Image J.

5.10. Imunofluorescência dos complexos placenta-endométrio decidualizado dos grupos tratados com CEM (GFP positivas)

Para a marcação de imunofluorescência as lâminas foram desparafinizadas e reidratadas como descrito anteriormente no item 5.9., a exceção do banho em água corrente que neste caso ocorreu em água destilada. Em seguida as lâminas foram colocadas em banho maria imersas em citrato de sódio a 60 °C para recrutamento antigênico por 1 hora. Após o resfriamento com auxílio de banhos em PBS 0,1 M, as lâminas foram fixadas novamente com solução de metanol a -20 °C por 10 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas em três banhos de PBS 0,1 M. Posteriormente as lâminas foram imersas em solução de glicina para bloqueio da atividade enzimática por 30 min. Após isso, as lâminas foram novamente lavadas em três banhos de PBS 0,1 M.

Após esta etapa, as lâminas foram incubadas no escuro por uma hora em temperatura ambiente, com soro de bloqueio (BSA - Sigma) a 10%. Em seguida, foi realizada incubação overnight com o anticorpo primário Anti-GFP (1:1000; Abcam, refab6673, San Diego, California, EUA) a 4°C, também no escuro.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas cinco vezes em PBS 0,1 M em banhos de 5 min cada. Após isso, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário fluorescente específico rabbit anti-goat IgG (1:1000; Abcam, refab150141, San Diego, California, EUA), no escuro e em temperatura ambiente, por uma hora. Em seguida, as lâminas sofreram banho de Sudan Black (Sigma) diluído em álcool etílico a 70% (v/v) para bloqueio da autofluorescência.

As lâminas foram montadas no escuro, utilizando-se DAPI e lamínula. As lâminas prontas foram mantidas a 4°C, no escuro, até a leitura em microscópio de varredura (VS120 Scanner, Olympus Corporation), durante a qual foi realizado o escaneamento total do complexo placenta-endométrio decidualizado em aumento de 40X, para análises posteriores no software Image J. A quantificação de CEMs GFP positivas encontradas por esta técnica foi apenas

descritiva devido ao esperado baixo número de células marcadas.

5.11. Descrição dos desfechos

Como desfecho foi considerado primeiramente o desfecho clínico (taxa de gestação dos animais (1) em cada um dos grupos de estudo e taxa de aborto dos animais (2) em cada um dos grupos de estudo). Além disso, como desfechos secundários, a mediana de placentas coletadas por animal, a mediana de placentas coletadas por corno uterino em cada um dos grupos de estudo e a quantidade de placentas coletadas no corno esquerdo versus o corno direito.

Considerou-se o evento “aborto” quando foi identificada a presença de placenta hemorrágica sem feto. Sendo assim, foi considerada também a mediana de placentas hemorrágicas por cornos uterino direito ou esquerdo. Além disso, a quantidade de placentas hemorrágicas coletadas no corno esquerdo versus corno direito.

A seguir é possível identificar como foi realizada cada uma das taxas consideradas no estudo:

Desfecho clínico:

$$1. \text{ Taxa de gestação} = \frac{n \text{ fêmeas grávidas}}{n \text{ total de fêmeas do grupo}} \times 100$$

$$2. \text{ Taxa de aborto} = \frac{n \text{ fêmeas com pelo menos uma placenta hemorrágica}}{n \text{ total de fêmeas grávidas do grupo}} \times 100$$

5.12. Cálculo amostral

O cálculo do N amostral foi feito utilizando-se a calculadora do site Sealed Envelope (<https://www.sealedenvelope.com/power/binary-superiority/>). Considerando a taxa de gestação como desfecho clínico principal com base em estudos anteriores do grupo de pesquisa em que foi verificada uma taxa de gestação de 100% nos animais do grupo sham (aqui considerados controle) e de 50% no grupo de endometriose induzida tratado com placebo, para um poder de teste (beta) de 80% e nível de significância (alfa) de 5%, são necessários 8 animais por grupo de estudo.

5.13. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0. A distribuição das variáveis foi avaliada usando-se o teste de Kolmogorov-Smimov para testar a normalidade da amostra. Para a comparação entre as taxas de gestação foi utilizado o teste Exato de Fischer. Já para as variáveis quantitativas (peso das fêmeas, média de placentas coletadas saudáveis, hemorrágicas e totais tanto por corno uterino quanto por animal, área da placenta total e por regiões) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Foi considerado como significativo valores de $p < 0,05$.

6. Resultados e Discussão

Efeito da administração intrauterina de CXCL12 ou de células tronco mesenquimais nos resultados de gestação em camundongos com endometriose induzida

SAWA, Aline Gonçalves; ROSA-E-SILVA, Ana Carolina Japur de Sá.

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Resumo

Camundongos C57BL/6 selvagens foram induzidos cirurgicamente à endometriose e sham. Depois de uma semana do tratamento de CXCL12, ou células estromais mensenquimais (CEM) ou placebo as fêmeas foram colocadas com machos férteis para acasalamento por até 4 semanas. O tratamento com CXCL12 e CEM aumentou a taxa de gestação do grupo endometriose de 50% (EndoPI) para 100% (EndoCX e EndoCEM), igualando-se aos grupos sham, que também obtiveram taxa de gestação de 100% em todos os tratamentos (ShamCX, ShamCEM, ShamPI). Não houve diferença no tamanho da ninhada, nem na prevalência de aborto nos grupos estudados. Além disso, também não houve diferença na análise histomorfométrica realizada nas placentas, tanto na área por camadas quanto em sua totalidade. Na imunofluorescência não foram identificadas CEM nos complexos placenta-endométrio decidualizado analisados. Dessa forma, pode-se aventar que a ação dessas células tanto por si só, quanto por meio da ação quimioatratadora do CXCL12, pode estar relacionada a mecanismos moleculares indiretos. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmação dos possíveis mecanismos de ação das CEM no incremento da fertilidade.

Introdução

A endometriose é uma desordem crônica inflamatória dependente de estrogênio, caracterizada pela presença de tecido endometrial glandular ou estromal fora da cavidade uterina¹. Ela não possui cura e seu tratamento em mulheres que possuem desejo de concepção basicamente se resumem a utilização das técnicas de reprodução assistida de baixa e/ou alta complexidade^{2,3,4,5}. Estima-se que 35 a 50% das mulheres com endometriose possuem infertilidade como um sintoma associado à doença⁶. Algumas relações causais diretas são mais facilmente encontradas para correlacionar essa situação, como alterações anatômicas na região pélvica devido a aderências locais provocadas por focos ectópicos da doença. Porém, também existem algumas relações indiretas ainda em estudos, pois seus mecanismos e vias de sinalização ainda não estão bem caracterizadas, como a implantação embrionária prejudicada

devido à baixa receptividade endometrial^{7,8,9}.

Estudos relacionados à infertilidade e possíveis efeitos terapêuticos medicamentosos normalmente são limitados ao uso de modelo animal experimental, devido às normas éticas de pesquisas em seres humanos. Além disso, muitas vezes os tratamentos medicamentosos ainda não estão aprovados para o uso em humano para esse fim, dificultando ainda mais os estudos dessa área em seres humano. Sendo assim, em sua maioria, os estudos acontecem no modelo murino, como descrito nesse artigo.

Sugere-se que os focos ectópicos da endometriose direcionam as células reparativas provenientes da medula óssea para si, comprometendo o processo reparativo endometrial na presença de endometriose induzida cirurgicamente em camundongos, além de causar perda parcial da fertilidade nesses animais devido à diminuição da receptividade endometrial^{10,11,12,13}. Nesse sentido, o uso de células estromais mesenquimais (CEM) vem sendo empregado como alternativas terapêuticas em diversos tratamentos, como doenças cardíacas¹⁴ e neurológicas¹⁵. Portanto, o presente artigo pretende avaliar o efeito da administração de CEM ou de CXCL12 (uma quimiocina de células tronco) em camundongos fêmeas com endometriose induzida com relação aos desfechos reprodutivos e avaliar o potencial destas terapias como alternativa de tratamento a mulheres com endometriose e infertilidade. Além disso, este estudo avalia a distribuição na placenta e decídua de células estromais mesenquimais (GFP positivas) injetadas no útero pré-concepcional dos animais.

Material e Métodos

Animais

Camundongos (*Mus musculus*) selvagens da linhagem C57BL/6 com seis a oito semanas de vida foram utilizados no estudo, seguindo todos os protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animais da FMRP-USP.

Isolamento de células estromais mesenquimais

Para o isolamento das CEM foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 transgênicos (GFP positivos; n = 4) e foi seguido o protocolo descrito por Zhu e colaboradores (2010)¹⁶. Já para a fenotipagem das células foi realizada citometria de fluxo (BD FACsCanto) dos seguintes marcadores: SCA-1-PE, CD11b-PE, CD34-PE, CD31-PE e CD45-PE (todos BD-Pharmingen), além do controle ficoeritrina (PE, do inglês phycoerythrin).

Endometriose e sham cirúrgico

A indução de endometriose cirúrgica (n = 18) ocorreu após analgesia com Meloxicam 0,2% na dosagem de 5 mg/kg via subcutânea e anestesia inalatória de Isoflurano (Virbac) 3,0% concentração alveolar para indução inicial e de 1,5 a 2,0% do mesmo anestésico para manutenção durante o procedimento cirúrgico. Inicialmente foi realizada a retirada dos cornos uterinos doadores (n = 18), lavados em PBS e divididos em dois fragmentos de 5 mm² cada. Em seguida, os fragmentos uterinos foram suturados ao peritônio parietal das fêmeas receptoras simetricamente distribuídos dois de cada lado, com ponto único. Como controle, os animais do grupo sham (n = 18) receberam os mesmos quatro pontos de sutura peritoneal, porém sem o tecido endometrial.

Tratamentos

Após quatro semanas foram realizados os tratamentos: 1×10^6 CEM/animal e 2,5 µg/animal de CXCL12 e placebo (PBS), injetando 75 µL/corno diretamente em cada corno uterino das fêmeas. Sendo assim, foram formados seis grupos de estudo: endometriose + CXCL12 – (EndoCX; n = 6); endometriose + células estromais mesenquimais (EndoCEM; n = 6); endometriose + placebo (EndoPI; n = 6); sham + CXCL12 (ShamCX; n = 6); sham + células estromais mesenquimais (ShamCEM; n = 6) e sham + placebo (ShamPI; n = 6).

Acasalamento com machos e gestação

Após uma semana da injeção de um dos três tratamentos, as fêmeas foram expostas a machos férteis previamente testados para acasalamento por até 4 semanas. Fêmeas consideradas grávidas (acima de 24 g) eram separadas e constantemente pesadas até atingirem aproximadamente 28 a 30 g para a eutanásia e coleta dos complexos placenta-endométrio decidualizado e um fragmento de corno uterino de região não adjacente à placenta.

Histomorfometria dos complexos placenta-endométrio decidualizado.

As amostras dos complexos placenta-endométrio decidualizado foram fixadas em paraformaldeído 4% (Sigma) por até 24 h. Em seguida foi realizado processo de desidratação do tecido, seguido de emblocamento em parafina e montagem dos cortes do tecido em lâminas silanizadas. Após isso, as lâminas foram desparafinizadas e reidratadas, em seguida coradas com Hematoxilina por 40 seg, lavadas com água corrente e coradas novamente, agora com Eosina por 10 seg. Finalmente, as lâminas foram desidratadas e montadas com auxílio de bálsamo de Canadá. As lâminas prontas foram lidas em microscópio de varredura (VS120

Scanner, Olympus Corporation), a qual foi realizado um escaneamento total da placenta em aumento de 10X, para análises posteriores no software Image J. Foram analisadas a área total da placenta e a área das seguintes regiões separadamente: decídua materna, zona juncional e labirinto dos materiais coletados.

Imunofluorescência para GFP

Para a imunofluorescência as lâminas com os cortes de tecido foram previamente desidratadas e emblocadas em parafina. Para a marcação de Anti-GFP (1:1000; Abcam, refab6673, San Diego, California, EUA), o material foi desparafinado e reidratado. Após isso, foi realizado banho em citrato de sódio (1 h, 60 °C), seguido de banho em solução de metanol (10 min, -20 °C) e banho em solução de glicina (30 min, temperatura ambiente). Em seguida, as lâminas foram incubadas, no escuro, com soro de bloqueio 10% (BSA, 1 h, temperatura ambiente). Depois, o material foi incubado também no escuro com o anticorpo primário Anti-GFP (1:1000, overnight, 4 °C). No dia seguinte, foi realizada a incubação no escuro com anticorpo secundário específico rabbit anti-goat IgG (1:1000; Abcam, refab150141, San Diego, California, EUA – 1 h, temperatura ambiente). Depois as lâminas sofreram banho Sudan Black (70% v/v em álcool etílico, Sigma) para bloqueio da autofluorescência e então elas foram montadas no escuro com DAPI.

Desfechos analisados

Foram analisados os desfechos clínicos: taxa de gestação dos animais em cada um dos grupos de estudo e taxa de aborto dos animais em cada um dos grupos de estudo. Além disso, foram analisados desfechos secundários: distribuição do peso das fêmeas grávidas, mediana de placentas coletadas por animal em cada grupo, mediana de placentas coletadas por animal por corno uterino (direito e esquerdo) em cada um dos grupos do estudo, quantidade de placentas coletadas no corno esquerdo versus corno direito, mediana de placentas hemorrágicas coletadas por animal por corno uterino (direito e esquerdo) e a quantidade de placentas hemorrágicas coletadas no corno esquerdo versus corno direito.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0. A distribuição das variáveis foi avaliada quanto a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smimov. Para a comparação entre as taxas de gestação foi utilizado o teste Exato de Fischer. E para as variáveis quantitativas (peso das fêmeas, média de placentas coletadas saudáveis,

hemorrágicas e totais tanto por corno uterino quanto por animal, área da placenta total e por regiões) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Foi considerado como significativo valores de $p < 0,05$.

Resultados

Fenotipagem celular

Na análise de citometria de fluxo foram analisados os seguintes marcadores de superfície celular: SCA-1 (Antígeno de Célula Tronco 1), CD11b (marcador de células imunes), CD34, CD31 e CD45 (marcadores de células hematopoiéticas). Foi obtido um total de 5 mil eventos e foi observado que as células utilizadas são 99,9% positivas para SCA-1 e 99,2%, 99,2%, 100% e 99,5% não marcadas para os respectivos marcadores: CD11b, CD34, CD31 e CD45. Portanto, essas características sugerem que as células utilizadas são células estromais mesenquimais com quase 100% de pureza.

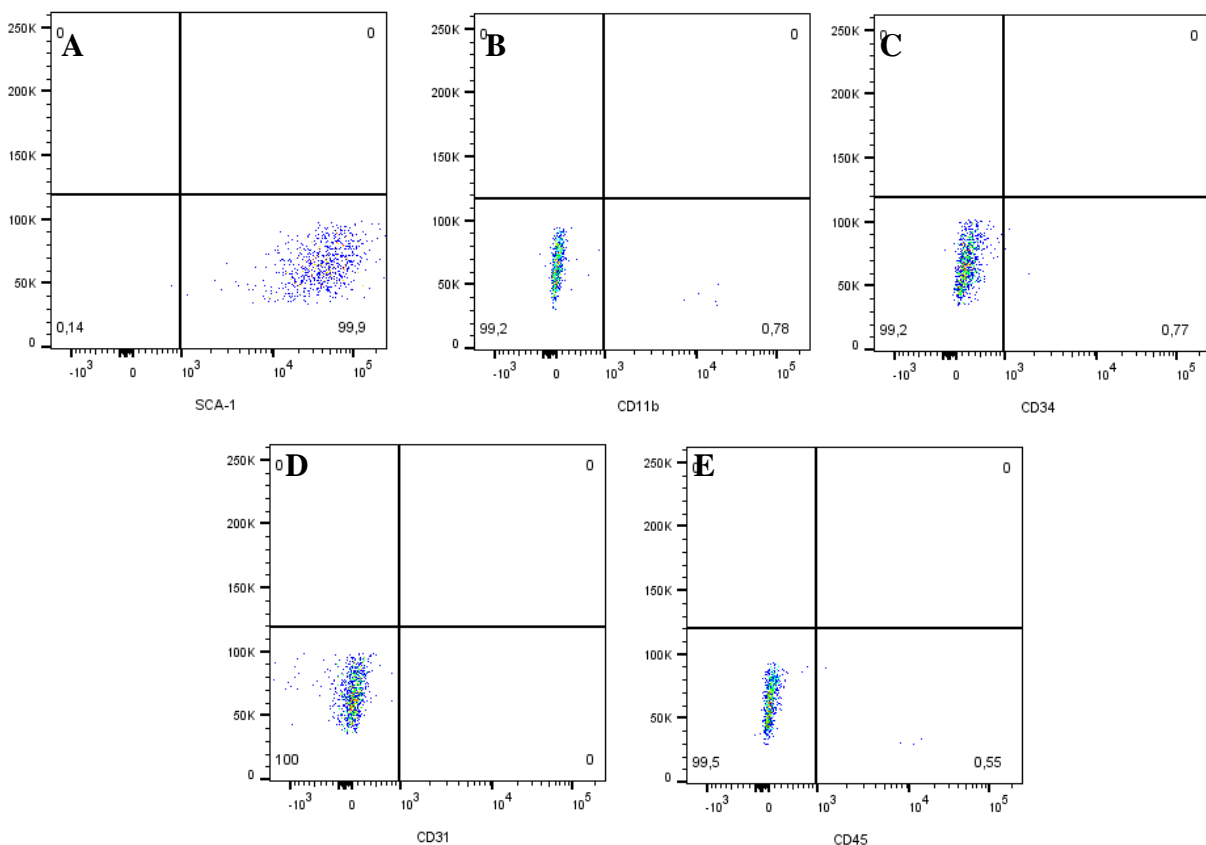


Figura 6. Fenotipagem da população de células estromais mesenquimais isoladas, cultivadas e injetadas nos animais dos grupos CEM.

Legenda: Marcação das CEMs utilizadas por citometria de fluxo. A) Marcação com SCA-1, B) Marcação com CD11b, C) Marcação com CD34, D) Marcação com CD31, E) Marcação com CD45.

Desfechos clínicos

A taxa de gestação em todos os grupos sham foi de 100%, sendo eles: ShamCEM (6/6), ShamCX (6/6) e ShamPI (6/6). Já no grupo endometriose, o grupo que recebeu placebo teve uma taxa de gestação de 50% (3/6), enquanto que os grupos tratados com CX (6/6) e com CEM (6/6) tiveram ambas taxas de gestação de 100% ($p=0,0168$), igualando-se aos grupos sham (Figura 7).

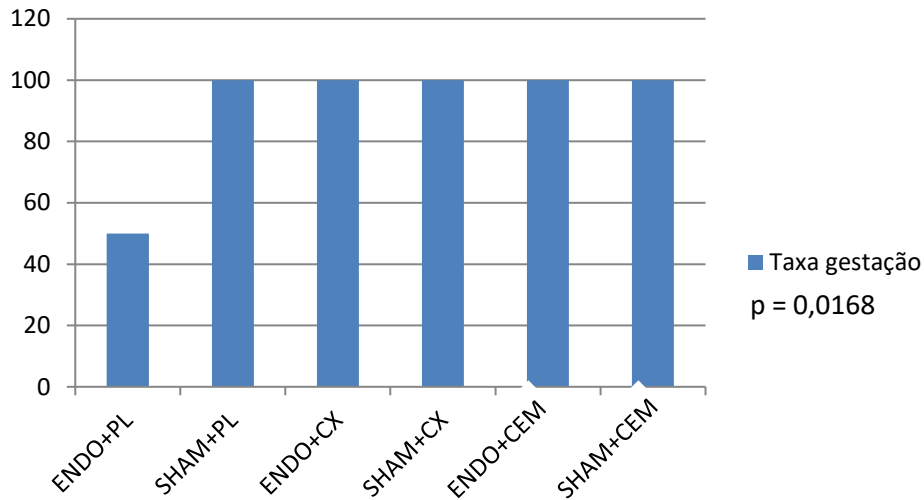


Figura 7. Gráfico das taxas de gestação por grupo do estudo.

Legenda: EndoCEM (endometriose induzida tratado com células estromais mesenquimais), EndoCX (endometriose induzida tratado com CXCL12), EndoPI (endometriose induzida tratado com placebo), ShamCEM (sham tratado com células estromais mesenquimais), ShamCX (sham tratado com CXCL12) e ShamPI (sham tratado com placebo). Letras diferentes representam diferenças ($p<0,05$). Entende-se por taxa de gestação a porcentagem de fêmeas que ficaram grávidas em relação ao total de fêmeas de cada grupo.

Distribuição de peso das fêmeas grávidas

Em relação ao peso das fêmeas no momento da cesárea para a coleta dos complexos placenta-endométrio decidualizado foi observada uma diferença estatística entre os grupos EndoCEM, EndoCX, EndoPI e ShamCEM em relação aos grupos ShamCX e ShamPI. Sendo que os últimos apresentaram maior peso quando comparados aos demais grupos do estudo (Figura 8).

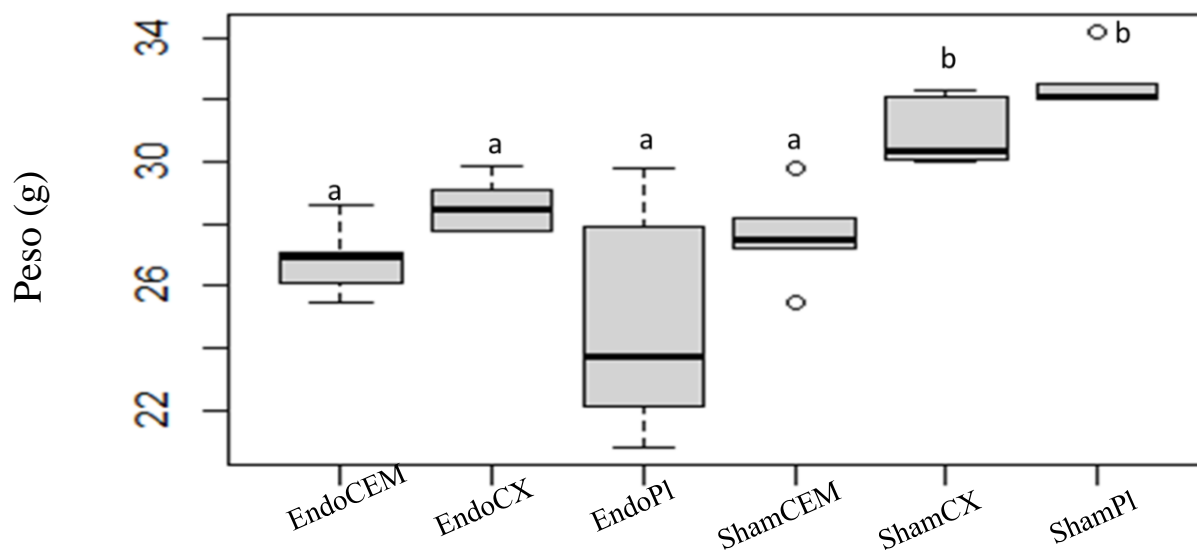


Figura 8. Distribuição de peso das fêmeas grávidas no momento da cesárea.

Legenda: EndoCEM (endometriose induzida tratado com células estromais mesenquimais), EndoCX (endometriose induzida tratado com CXCL12), EndoPI (endometriose induzida tratado com placebo), ShamCEM (sham tratado com células estromais mesenquimais), ShamCX (sham tratado com CXCL12) e ShamPI (sham tratado com placebo). Letras diferentes representam diferenças ($p < 0,05$).

Análise dos complexos placenta-endométrio decidualizado

Foram coletadas todas as placentas com desenvolvimento normal e placentas hemorrágicas. Estas foram consideradas resquícios de placentas inicialmente formadas, mas que não continuaram seu desenvolvimento normalmente, sendo assim, não estavam completamente desenvolvidas e não apresentavam fetos (Figura 9.B). Neste caso, foi considerado que um aborto ocorreu.

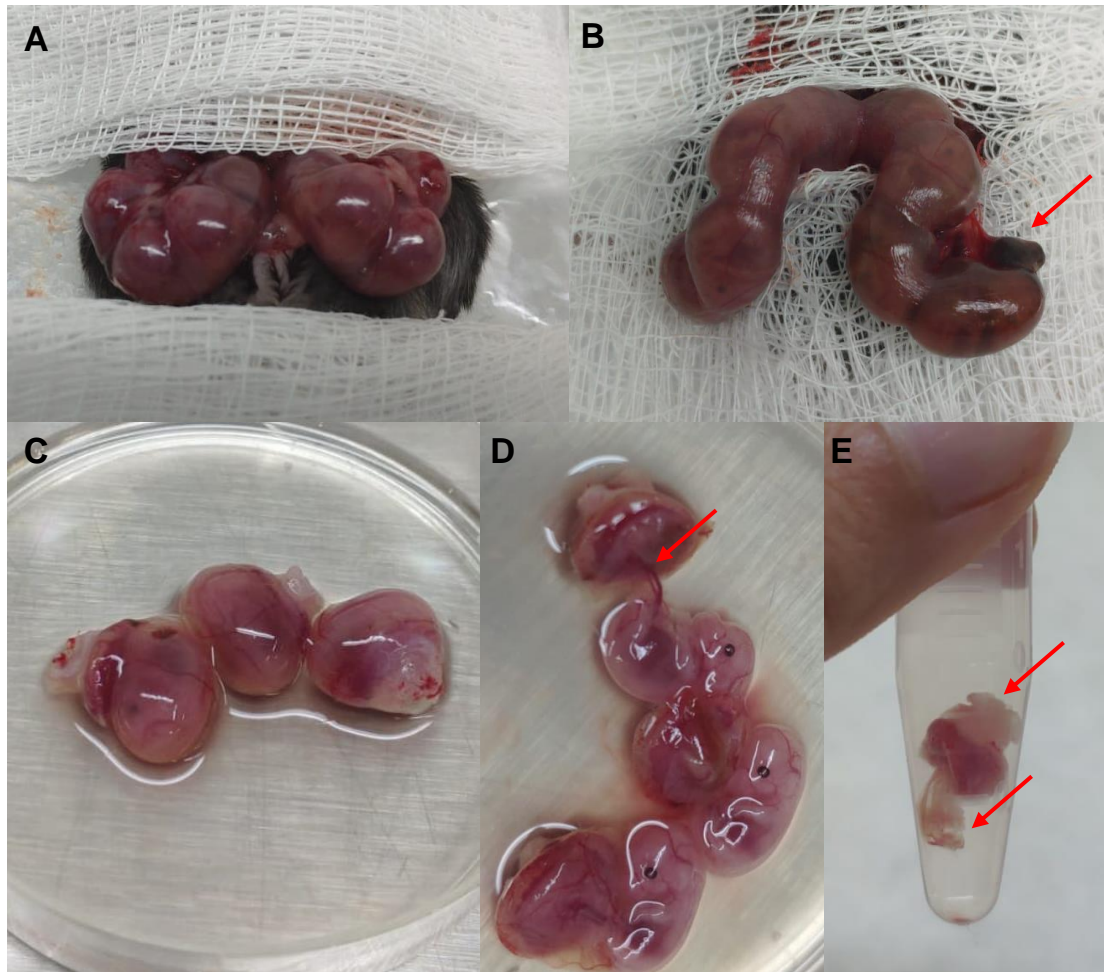


Figura 9. Representação do processo de coleta dos complexos placenta-endométrio decidualizado.

Legenda: A e B) Cornos uterinos com conjunto placenta/feto em seu interior, B) Placenta hemorrágica indicada pela seta. C) Conjuntos placenta/feto separados para coleta das amostras, envoltos pela bolsa amniótica. D) Conjuntos placenta/feto evidenciando o cordão umbilical indicado pela seta. E) Complexo placenta-endométrio decidualizado subjacente (seta superior) e cordão umbilical (seta inferior) coletados após eutanásia.

Em relação ao número de placentas saudáveis, hemorrágicas e totais coletadas das fêmeas grávidas de ambos os grupos (endometriose e sham) e tratamentos (CXCL12, Células Estromais Mesenquimais ou Placebo) não foi observada nenhuma diferença estatística (Tabela 2). Curiosamente foi observado um maior número de placentas no corno direito quando comparado ao corno esquerdo, em média foram coletadas 1,26 placentas a mais no corno direito em relação ao esquerdo ($p= 0,0092$).

Não houve diferença na prevalência de abortos entre os grupos no geral e tampouco na avaliação por cornos separadamente (Tabela 2).

Tabela 2 – Quantidade de placentas coletadas por corno uterino e totais.

Variável	Parâmetro	EndoCEM	EndoCX	EndoPI	ShamCEM	ShamCX	ShamPI	p-value
PL-CE	Mediana	4,0	3,5	4,0	4,0	3,5	4,0	0,8134
	Mínimo	3,0	1,0	2,0	1,0	1,0	3,0	
	Máximo	6,0	4,0	6,0	4,0	7,0	5,0	
PLH-CE	Mediana	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4524
	Mínimo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	Máximo	1,0	2,0	1,0	0,0	2,0	1,0	
PL-CD	Mediana	5,0	4,0	5,0	5,0	4,5	5,5	0,1716
	Mínimo	4,0	2,0	2,0	5,0	2,0	4,0	
	Máximo	6,0	5,0	6,0	7,0	7,0	7,0	
PLH-CD	Mediana	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0812
	Mínimo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	Máximo	1,0	3,0	1,0	0,0	2,0	1,0	
PL-T	Mediana	9,0	8,0	9,0	9,0	9,0	10,0	0,0812
	Mínimo	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	
	Máximo	10,0	11,0	10,0	9,0	10,0	11,0	

Legenda: temos que PL-CE (placentas saudáveis coletadas no corno esquerdo), PLH-CE (placentas hemorrágicas coletadas no corno esquerdo), PL-CD (placentas saudáveis coletadas no corno direito), PLH-CD (placentas hemorrágicas coletadas no corno direito) e PL-T (placentas totais – somatório de saudáveis e hemorrágicas – coletadas em ambos os cornos direito e esquerdo).

Análise histomorfométrica de placenta

Para as análises morfológicas e morfométricas foram analisadas: área de placenta total e área das camadas placentárias separadamente (decídua materna, zona juncional e labirinto) das imagens previamente escaneadas em aumento de 10X. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa histomorfométrica dos parâmetros analisados entre os grupos do estudo ($p > 0,05$).

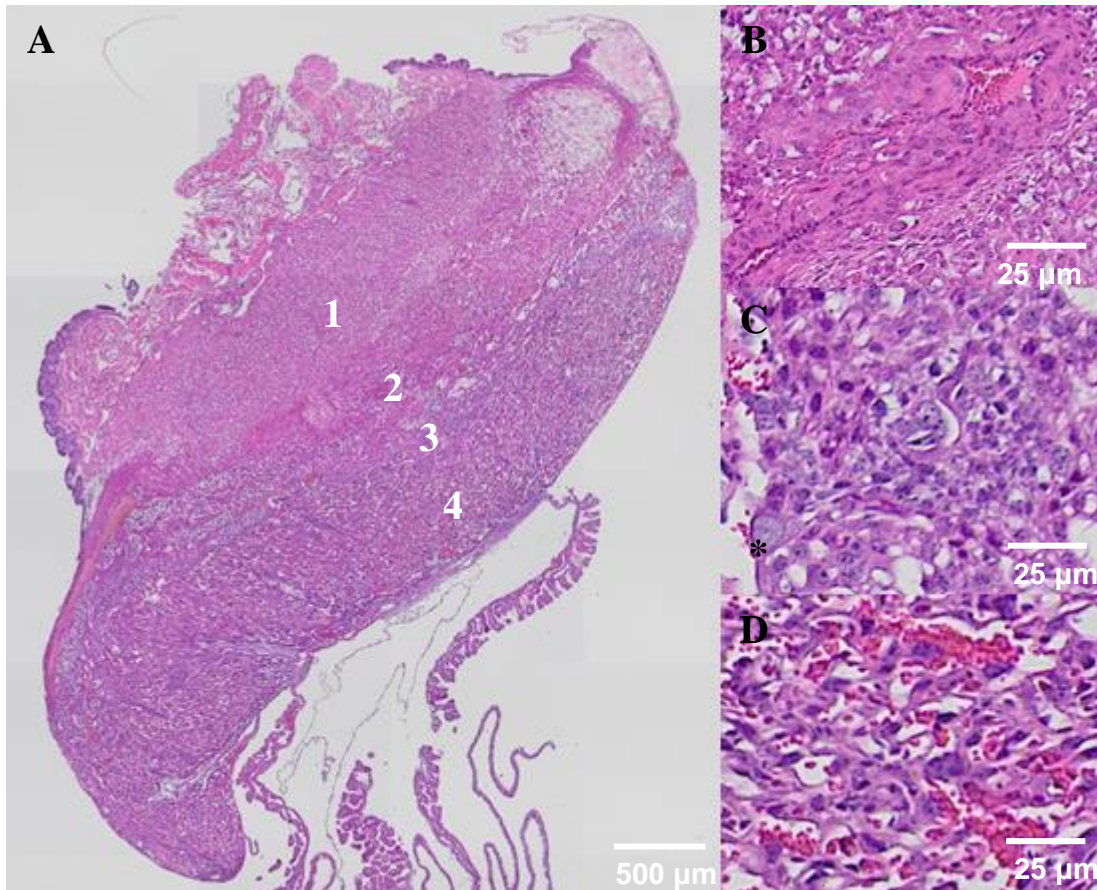


Figura 10. Análise histomorfométrica das placentas por meio da coloração HE.

Legenda: A) Visão global da placenta e divisão nas regiões analisadas: 1 – região uterina materna, 2 - região da decídua materna, 3 – região da zona juncional, 4 – região do labirinto. B) Região da decídua materna evidenciando os vasos maternos em aumento de 10X. C) Região da zona juncional evidenciando as células trofoblásticas gigantes parietais (*) e espongiotrofoblastos em aumento de 10X. D) Região do labirinto evidenciando a rica vascularização local em aumento de 10X.

Imunofluorescência Anti-GFP de células estromais mesenquimais

As imagens foram analisadas após escaneamento total dos complexos placenta-endométrio decidualizado em aumento de 40X. No controle positivo (corno uterino de uma fêmea C57BL/6 transgênica GFP positiva) é possível observar a marcação do Anti-GFP e do DAPI. No controle negativo (material placentário coletado sem a ação do anticorpo primário Anti-GFP) é possível observar apenas a marcação do DAPI, sem marcação do Anti-GFP. Já nos grupos tratados com células estromais mesenquimais, tanto endometriose quanto sham, não foi possível encontrar marcação de Anti-GFP como demonstrado na Figura 11.

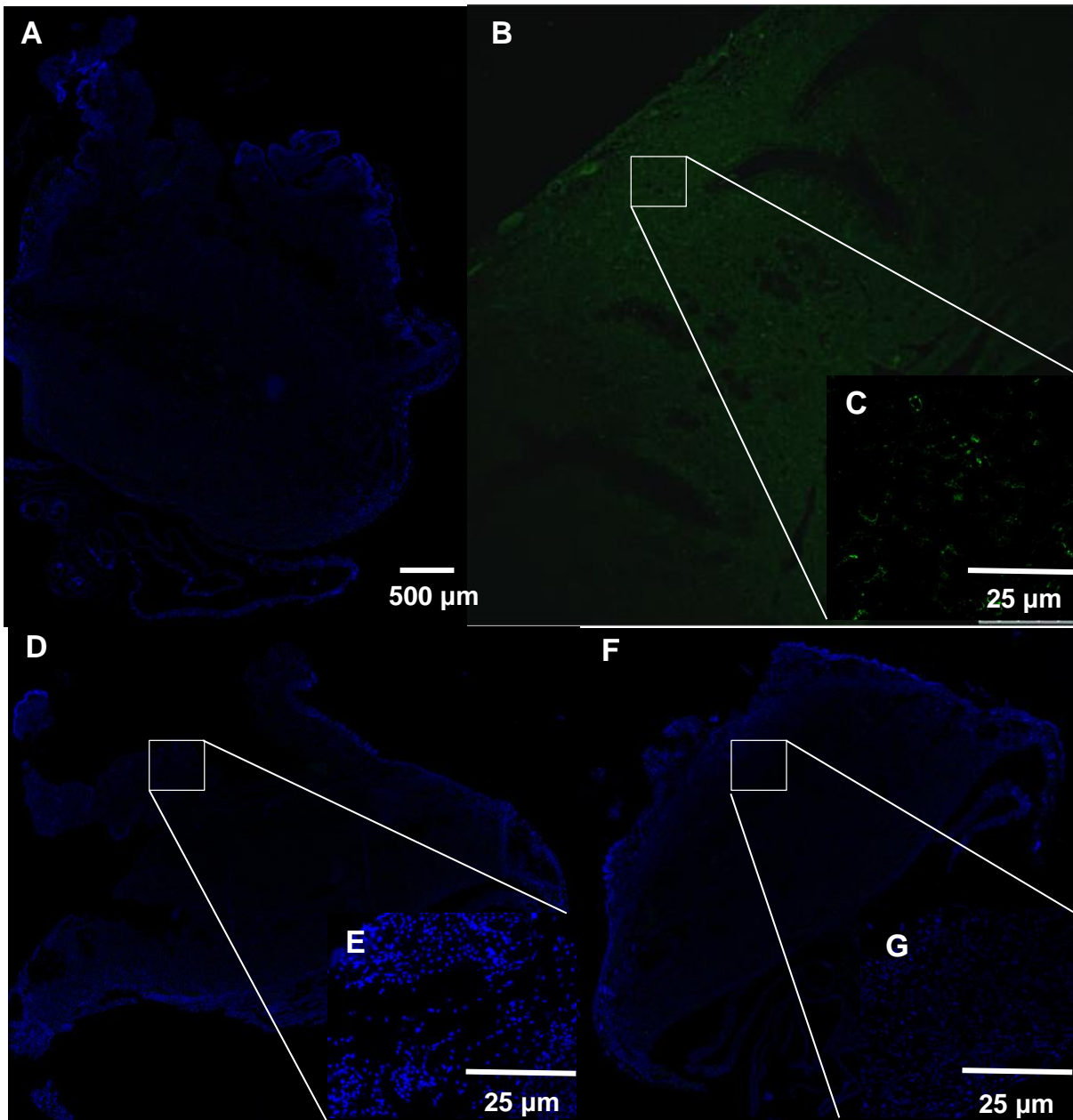


Figura 11. Marcação para GFP por imunofluorescência no complexo placenta-endométrio decidualizado nos grupos que receberam a injeção das CEMs.

Legenda: Análise das lâminas de imunohistoquímica dos grupos tratados com células estromais mesenquimais GFP positivas. A) Controle negativo (placenta) apenas com coloração DAPI e ausência de marcação com Anti-GFP. B) Controle positivo (corno uterino proveniente de fêmea transgênica - GFP positiva) com marcação do Anti-GFP. C) Células marcadas com Anti-GFP em aumento de 40X. D) Placenta do grupo Endometriose + células estromais mesenquimais apenas com coloração DAPI e ausência de marcação Anti-GFP. E) Células marcadas do respectivo grupo (EndoCEM) em aumento de 40X. F) Placenta do grupo Sham + células estromais mesenquimais apenas com coloração DAPI e ausência de marcação Anti-GFP. G) Células marcadas do respectivo grupo (ShamCEM) em aumento de 40X.

Discussão

Neste estudo pudemos inicialmente confirmar achados de estudos prévios do grupo em que a indução de endometriose em camundongos fêmeas de acordo com a técnica descrita compromete a fertilidade destes animais, reduzindo de 100% para 50% a taxa de gestação. Também ficou demonstrado neste estudo que o uso de células estromais mesenquimais (CEM) e também da quimiocina CXCL12, administrados separadamente, promoveu a recuperação da fertilidade dos animais estudados. Além disso, não foram encontradas diferenças no tamanho de ninhada (baseado pelo número de placentas saudáveis) tanto por animal quanto comparado por corno uterino, nem diferença na prevalência de aborto (baseada pelo número de placentas hemorrágicas) tanto por animal quanto por corno uterino. O mecanismo exato pelo qual as terapias agiram na melhora dos desfechos reprodutivos ainda não está claro.

Sabe-se que as células estromais mesenquimais possuem diferentes efeitos diante dos diferentes tipos celulares, incluindo a imunidade inata e adaptativa. Estudos sugerem que as células mesenquimais ocasionam alterações anti-inflamatórias, como reduzir ativação e citotoxicidade das células NK e células T reguladoras, por exemplo. Sendo assim, são células potencialmente promissoras no tratamento de doenças inflamatórias, como a endometriose¹⁷.

Essas células contribuem com a homeostase tecidual, estando relacionadas com o processo reparativo de diversos tecidos, como do endométrio feminino, por exemplo^{18,19}. Estudos anteriores levantaram a hipótese de existir uma menor migração de células estromais provenientes da medula óssea para o endométrio tópico a fim de auxiliar no processo reparativo cíclico endometrial na presença da endometriose, já que essas células poderiam ser atraídas pelos focos ectópicos da doença^{10,11,20}. Nesse sentido, pessoas com endometriose e consequente reduzida capacidade de atrair células de reparo para o endométrio poderiam apresentar menor capacidade desse tecido em expressar moléculas básicas para a o processo de implantação embrionária, atuando então como um possível mecanismo indireto de infertilidade ligado à endometriose^{12,21}.

Nesse sentido, sabendo-se que as células estromais mesenquimais possuem propriedades como alto potencial de diferenciação, capacidade imunorreguladora e de migração *in vivo* para locais lesados^{18,22}. Sendo assim, elas tornam-se potencialmente candidatas ao uso como terapêutica na reparação de diversos danos teciduais e doenças, como doenças cardíacas²³, neurológicas²⁴, inflamatórias²⁵ e mais recentemente para tratamento de pacientes de COVID-19 severa^{26,27}. Além disso, as CEM são amplamente estudadas para o tratamento no sistema reprodutor feminino, melhorando a fertilidade^{28,29,30,31}, atuando na regeneração endometrial

relacionada ao incremento na receptividade endometrial^{32,33} de endométrio fino^{34,35} e de endométrio com injúrias, como a Síndrome de Asherman^{36,37}, por exemplo. Esses achados devem-se principalmente pela atuação das células estromais mesenquimais, assim como outras populações celulares que estão envolvidas no processo de angiogênese e regeneração endometrial, por meio de recomposição de vasos, glândulas e estroma^{10,13,38,39}.

Sendo assim, nossos achados tanto por meio do uso CEM diretamente quanto intermediada pelo uso do CXCL12, um quimioatratador de células tronco/estromais sistêmicas²⁰ para o local de administração, podem ter mediado os efeitos de incremento nos desfechos clínicos encontrados, assim como alguns dos achados citados anteriormente. Não foi possível identificar um efeito direto dos tratamentos testados neste estudo sobre a anatomia das estruturas endometriais e placentárias, uma vez que não houve diferença histomorfométrica de área total, além de áreas por regiões placentárias (decídua materna, zona juncional e labirinto) analisadas. Além disso, também não foram encontradas células marcadas positivamente para Anti-GFP na imunofluorescência do complexo placenta-endométrio decidualizado de ambos os grupos tratados com CEM (endometriose e sham). Portanto, provavelmente as CEM injetadas diretamente no útero ou endógenas, atraídas pela quimiocina, não têm um papel estrutural na composição da placenta, provavelmente atuando indiretamente por meio da secreção de substâncias que favoreçam a receptividade endometrial.

Estudos demonstram que mulheres com endometriose possuem a morfologia das células lúteas alteradas, diminuindo então a produção de progesterona, um importante fator na receptividade endometrial⁴⁰. Estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que o uso do CXCL12 restaurou a expressão de receptores de progesterona no endométrio de camundongos induzidos a endometriose, além do aumento na expressão de $\alpha V\beta 3$ integrina outro importante fator favorável a receptividade endometrial⁴¹. Este fato está em consonância com os achados na literatura, indicando que o uso de CXCL12 tem papel na melhora da receptividade endometrial^{42,43,44} e angiogênese local⁴⁵.

Outro potencial mecanismo de ação indireto das células estromais mesenquimais é a promoção de processos angiogênicos (secreção de VEGFs e Prostaglandinas)^{46,47,48,49}, decidualização intrauterina⁵⁰ mediada pelas células estromais endometriais⁵¹, reparação tecidual^{52,53,54} e prevenção de apoptose⁵⁵, que podem ocorrer tanto diretamente pela ação das CEM como pelos exossomos altamente produzidos e liberados pelas mesmas, possuindo propriedades e ações muito semelhantes⁵⁶.

Sendo assim, acreditamos que a ação benéfica no incremento dos desfechos reprodutivos encontrados tanto pela ação diretamente das CEMs, quanto pela ação indireta das mesmas

células endógenas atraídas pelo uso da quimiocina CXCL12, ocorreu por meio de mecanismos moleculares indiretos. Uma hipótese seria a promoção da expressão de moléculas e/ou fatores de crescimento que favoreçam a implantação embrionária. Porém, mais estudos avaliando-se marcadores ligados ao processo de implantação e placentação são necessários para confirmação desta hipótese. Ademais, temos que independente do mecanismo de ação dessas células, estes achados clínicos abrem um leque de novas possibilidades terapêuticas pouco-invasivas para pacientes com endometriose associada a infertilidade.

Referências

1. Giudice, L.C.; Kao, L.C. Endometriosis. *The Lancet*. v. 364, n. 9447, p. 1789-1799, 2004.
2. Tomassetti, C.; D'Hooghe, T. Endometriosis and infertility: insights into the causal link and management strategies. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet*. v. 51, p. 25-33, 2018.
3. Makuch, M. et al. Barriers to access to infertility care and assisted reproductive technology within the public health sector in Brazil. *FVV Ob. Gyn*. v. 4, n. 4, p.221-226, 2012.
4. Makuch, M. et al. Inequitable access to assisted reproductive technology for the low-income Brazilian population: a qualitative study. *Hum. Reprod*. v. 26, n. 8, p. 2054-2060, 2011.
5. Makuch, M. et al. Low priority level for infertility services within the public health sector: a Brazilian case study. *Hum. Reprod*. v. 25, p. 430-435, 2010.
6. ASRM. American Society for Reproductive Medicine. Endometriosis and infertility: a committee opinion. *Fertil. Steril*. v. 98, n. 3, p. 591-598, 2012.
7. Miller, J.E. et al. Implications of immune dysfunction on endometriosis associated infertility. *Oncotarget*. v. 8, n. 4, p. 7138-7147, 2017.
8. Bulletti, C. et al. Endometriosis and infertility. *J. Assist. Reprod. Genet*. v. 27, n. 8, p. 441-447, 2010.
9. Filip, L. et al. Endometriosis associated infertility: a critical review and analysis on etiopathogenesis and therapeutic approaches. *Medicina*, v. 56, n. 460, p. 1-23, 2020.
10. Pluchino, N.; Taylor, H.S. Endometriosis and stem cell trafficking. *Reprod. Sci*. v. 23, n. 12, p. 1616-1619, 2016.
11. Sakr, S. et al. Endometriosis impairs bone marrow-derived stem cell recruitment to the uterus whereas bazedoxifene treatment leads to endometriosis regression and improved uterine stem cell engraftment. *Endocrinology*. v. 155, n. 4, p. 1489-1497, 2014.
12. Rosa-e-Silva, A.C.J.S. et al. Dose-dependent decreased fertility in response to the burden of endometriosis in a murine model. *Reprod. Sci*. 2019.
13. Zhao, J. et al. Uterine infusion with bone marrow mesenchymal stem cells improves endometrium thickness in a rat model of thin endometrium. *Reprod. Sci*. v. 22, n. 2, p. 181-188, 2015.
14. Yu, G. et al. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells for cardiovascular diseases. *Cell Death Dis*. v. 11, n. 349, 2020.
15. Andrzejewska, A. et al. Mesenchymal stem cells for neurological disorders. *Adv. Sci*. v. 8, n. 7, 2021.
16. Zhu, H. et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nature*, v. 5, n. 3, p. 550-560. 2010.
17. Castro-Manrreza, M. E.; Montesinos, J. J. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J. Immunol. Res*. 2015.
18. Du, H.; Taylor, H.S. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells*. v. 25, n. 8, p. 2028-2026, 2007.

19. Tal, R. et al. A murine 5-fluorouracel-based submyeloablation model for the study of bone marrow-derived cell trafficking in reproduction. *Endocrinology*. v. 157, n. 10, p. 3749-3759, 2016.
20. Wang, X. et al. Chemoattraction of bone marrow-derived stem cells towards human endometrial stromal cells is mediated by estradiol regulated CXCL12 and CXCR4 expression. *Stem Cell Res.* v. 15, n. 1, p. 14-22, 2015.
21. Hufnagel, D. et al. The role of stem cells in the etiology and pathophysiology of endometriosis. *Semin. Reprod. Med.* v. 33, n. 5, p. 333-340, 2015.
22. Brown, C. et al. Mesenchymal stem cells: cell therapy and regeneration potential. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* v. 13, n. 9, 2019.
23. Miao, C. et al. A brief review: the therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Stem Cell Res. Ther.* v. 8, n. 242, 2017.
24. Uccelli, A. Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet Neurol.* v. 10, n. 7, p. 649-656, 2011.
25. Regmi, S. et al. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: challenges, opportunities, and future perspectives. v. 98, 2019.
26. Golchin, A. et al. Mesenchymal stem cell therapy for COVID-19: present or future. *Stem cell rev.* v. 16, p. 427-433, 2020.
27. Rajarshi, K. et al. Combating COVID-19 with mesenchymal stem cell therapy. *Biotechnol. Rep.* v. 26, 2020.
28. Rungsiwiwut, R. et al. Mesenchymal stem cells for restoring endometrial function: an infertility perspective. *Reprod. Med. Biol.* 2020.
29. Zhao, Y. Using mesenchymal stem cells to treat female infertility: an update on female reproductive diseases. *Stem Cells Int.* 2019.
30. Chang, Z. et al. Mesenchymal stem cells in preclinical infertility cytottherapy: a retrospective review. *Stem Cells Int.* 2021.
31. Gao, M. et al. Mesenchymal stem cells therapy: a promising method for the treatment of uterine scars and premature ovarian failure. *Tissue. Cell.* v. 74, 2022.
32. Esmailzadeh, S. et al. Receptivity markers in endometrial mesenchymal stem cells of recurrent implantation failure and non-recurrent implantation failure women: a pilot study. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* v. 46, n. 8, p. 1393-1402, 2020.
33. Wang, G. et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on repair and receptivity of damaged endometrium in rats. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* v. 47, n. 9, p. 3223-3231, 2021.
34. Sapozhak, L. M. et al. Application of autologous endometrial mesenchymal stromal/stem cells increases thin endometrium receptivity: a case report. *J. Med. Case Rep.* v. 14, n. 190, 2020.
35. Tersoglio, A. E. et al. Regenerative therapy by endometrial mesenchymal stem cells in thin endometrium with repeat implantation failure. A novel strategy. *JBRA Assist. Reprod.* v. 24, n. 2, p. 118-127, 2020.
36. Zhu, X. et al. Stem cells and endometrial regenerative: from basic research to clinical trial. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* v. 14, p. 293-304, 2019.
37. Strug, M.; Aghajanova, L. Making more womb: clinical perspectives supporting the development and utilization of mesenchymal stem cell therapy for endometrial regeneration and infertility. *J. Pers. Med.* v. 11, n. 1364, 2021.
38. Mints, M. et al. Endometrial endothelial cells are derived from donor stem cells in a bone marrow transplant recipient. *Hum. Reprod.* v. 23, n. 1, p. 139-143, 2008.
39. Gargett, C. E. et al. Endometrial regeneration and endometrial stem/progenitor cells. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* v. 13, n. 4, p. 235-251, 2012.
40. Cunha-Filho, J.S. et al. Physiopathological aspects of corpus luteum defect. In infertile patients with mild/minimal endometriosis. *J. Assist. Reprod. Genet.* v. 20, p. 117-121, 2003.

41. Rosa-e-Silva, A.C.J.S. et al. Uterine administration of CXCL12 increases pregnancy rates in mice with induced endometriosis. *F&S Science*. 2022.
42. Yi, K.W. et al. Bone marrow-derived cells or C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12) treatment improve thin endometrium in mouse model. *Biol. Reprod.* v. 100, n. 1, 2019.
43. Zlotkowska, A.; Andronowska, A. Chemokines as the modulators of endometrial epithelial cells remodelling. *Sci. Rep.* v. 9, n. 12968, 2019.
44. McIntosh, S.Z. et al. CXCR4 signaling at the fetal – maternal interface may drive inflammation and syncytia formation during ovine pregnancy. *Biol. Rep.* v. 104, n. 2, 2021.
45. Koo, H.S. et al. CXCL12 enhances pregnancy outcome via improvement of endometrial receptivity in mice. *Sci. Rep.* v. 11, n. 7397, 2021.
46. Kasper, G. et al. Mesenchymal stem cells regulate angiogenesis according to their mechanical environment. *Stem Cells.* v. 25, n. 4, 2007.
47. Bronckaers, A. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacol. Ther.* v. 143, n. 2, 2014.
48. Kwon, H.M. Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis. *Vasc. Pharmacol.* v. 63, n. 1, 2014.
49. Tao, H. et al. Proangiogenic features of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Stem Cells Int.* 2016.
50. Nafeesa, A.; Reshef, T. Endometrial stem cells: origin, biological function, and therapeutic applications for reproductive disorders. *Curr. Opin. Obstet.* v. 33, n. 3, 2021.
51. Xiaofang, K.; Hongcheng, Z. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) enhance endometrial stromal cell migration and epithelial-mesenchymal transition in adenomyosis through upregulation of neuropilin 1. *J. Biomater. Tissue Eng.* v. 12, n. 2, 2022.
52. Fu, X. et al. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells.* v. 8, n. 8, 2019.
53. Gnecci, M. et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cells in tissue repair. *Methods Mol. Biol.* P. 123-146, 2016.
54. Yang, J. et al. Role of TGF- β_3 and bone marrow mesenchymal stem cells on regeneration of myometrial injury in rats. *Sciences.* v. 15, n. 4, 2022.
55. Kot, M. et al. Secretion, migration and adhesion as key process in the therapeutic activity of mesenchymal stem cells. *Acta. Biochim. Pol.* v. 66, n. 4, p. 499-507, 2019.
56. Merino-Gonzalez, C. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote angiogenesis: potential clinical application. *Front. Physiol.* v. 09, 2016.

7. Conclusão

O tratamento com células estromais mesenquimais e com CXCL12 isoladamente, promoveram aumento das taxas de gestação em camundongos fêmeas com endometriose induzida, igualando-as aos animais do grupo sham.

Também não foi verificada a presença de células GFP+, ou seja, de CEMs nas placentas ou no leito placentário nos animais que receberam injeção destas células pré-concepcionais, sugerindo que o benefício em termos reprodutivos foi secundário a não por meio de uma participação direta destas células na composição da estrutura placentária ou decidual.

Desta forma, acreditamos que a melhora nas taxas de gestação ocorrida tanto pela injeção do CXCL12 como das CEMs nos cornos uterinos deva estar relacionada a mecanismos moleculares indiretos, por meio da promoção da expressão de moléculas e/ou fatores de crescimento que favoreçam a implantação embrionária. Entretanto, mais estudos são necessários, avaliando-se marcadores ligados ao processo de implantação e placentação para confirmação desta hipótese.

Independente do mecanismo de ação, estes achados clínicos abrem um leque de novas possibilidades terapêuticas para pacientes com endometriose associada a infertilidade.

REFERÊNCIAS

Achache, H.; Revel, A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human. Reprod. Up.* v. 12, n. 6, p. 731-746, 2006.

ASRM. American Society for Reproductive Medicine. Endometriosis and infertility: a committee opinion. *Fertil. Steril.* v. 98, n. 3, p. 591-598, 2012.

Baddoo, M. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J. Biol. Chem.* v. 89, n. 6, p. 1235-1249, 2003.

Bastian, C. et al. Isolation, selection and culture methods to enhance clonogenicity of mouse bone marrow derived mesenchymal stromal cell precursors. *Stem Cell Res. Ther.* v. 6, n. 151, 2015.

Bastu, E. et al. Role of Mucin 1 and Glycodelin A in recurrent implantation failure. *Fertil. Steril.* v. 103, n. 4, p. 1059-1064, 2015.

Bazoobandi, S. et al. Preventive effects of intrauterine injection of bone marrow-derived mesenchymal stromal cell-conditioned media on uterine fibrosis immediately after endometrial curettage in rabbit. *Stem Cells Int.* 2020.

Budiu, R.A. et al. A conditional mouse model for human MUC1-positive endometriosis shows the presence of anti-MUC1 antibodies and Foxp3⁺ regulatory T cells. *Dis. Model. Mech.* v. 2, n. 11-12, p. 593-603. 2009.

Bufang, X. et al. Pinopodes, leukemia inhibitory factor, integrin- β 3, and mucin-1 expression in the peri-implantation endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Fertil. Steril.* v. 98, n. 2, p. 389-395, 2012.

Bulletti, C. et al. Endometriosis and infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* v. 27, n. 8, p. 441-447, 2010.

Castro-Manreza, M.E.; Montesinos, J.J. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological and clinical applications. *J. Immunol.* 2015.

Chan, J. et al. Widespread distribution and muscle differentiation of human fetal mesenchymal stem cells after intrauterine transplantation in dystrophic mdx mouse. *Stem Cells.* v. 25, n. 4 p. 875-884, 2007.

Cezar, M.; Freitas, G. Endometriose mínima e técnicas de reprodução assistida: uma revisão. *Reprod. Clim.* v. 24, n. 3, p. 100-106, 2009.

Du, H.; Taylor, H.S. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells.* v. 25, n. 8, p. 2028-2026, 2007.

Ezquer, F.E. et al. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hypoglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biol. Blood Marrow Transplant.* v. 14, n. 6, p. 631-640, 2008.

Filip, L. et al. Endometriosis associated infertility: a critical review and analysis on etiopathogenesis and therapeutic approaches. *Medicina.* v. 56, n. 460, p. 1-23, 2020.

Fox, C. et al. Local and systemic factors and implantation: what is the evidence? *Fertil. Steril.* v. 105, n. 4, p. 873-884, 2016.

Gargett, C.E. et al. Endometrial regeneration and endometrial stem/progenitor cells. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* v. 13, n. 4, p. 235-251, 2012.

Giudice, L.C.; Kao, L.C. Endometriosis. *The Lancet.* v. 364, n. 9447, p. 1789-1799, 2004.

Giudice, L.C. et al. The molecular basis for implantation failure in endometriosis: on the road to Discovery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 955, p. 252-264, 2002.

Guillot, P.V. et al. Intrauterine transplantation of human fetal mesenchymal stem cells from first-trimester blood repairs bone and reduces fracture in osteogenesis imperfecta mice. *Blood.* v. 111, n. 3, p. 1717-1725, 2008.

Hogg, S.; Vyas, S. Endometriosis. *Obstet. Gynaecol. Reprod. Med.* v. 25, n. 5, p. 133-141, 2015.

Hufnagel, D. et al. The role of stem cells in the etiology and pathophysiology of endometriosis. *Semin. Reprod. Med.* v. 33, n. 5, p. 333-340, 2015.

Jabeen, S. et al. Isolation and identification of murine mesenchymal stem cells from bone marrow. *Int. J. Endorsing health Sci. Res.* v. 10, n. 2, p. 150-156, 2022.

Kitawaki, J. et al. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* v. 83, n. 1-5, p. 149-155, 2003.

Koo, H.S. et al. Embryo-derived chemokine CXCL12 enhance pregnancy outcome via improvement of endometrial receptivity. *Sci. Rep.* v. 11, n. 1, 2021.

Leonardi, M. et al. When to do surgery and when not to do surgery for endometriosis: a systematic review and meta-analysis. *J. Minim. Invasive Gynecol.* v. 27, n. 2, p. 390-407, 2020.

Lindner, U. et al. Mesenchymal stem or stromal cells: toward a better understanding of their biology? *Transfus. Med. Hemother.* v. 37, n. 2, p. 75-83, 2010.

Makuch, M. et al. Barriers to access to infertility care and assisted reproductive technology within the public health sector in Brazil. *FVV Ob. Gyn.* v. 4, n. 4, p. 221-226, 2012.

Makuch, M. et al. Inequitable access to assisted reproductive technology for the low-income Brazilian population: a qualitative study. *Hum. Reprod.* v. 26, n. 8, p. 2054-2060, 2011.

Makuch, M. et al. Low priority level for infertility services within the public health sector: a Brazilian case study. *Hum. Reprod.* v. 25, p. 430-435, 2010.

Miller, J.E. et al. Implications of immune dysfunction on endometriosis associated infertility. *Oncotarget.* v. 8, n. 4, p. 7138-7147, 2017.

Mints, M. et al. Endometrial endothelial cells are derived from donor stem cells in a bone marrow transplant recipient. *Hum. Reprod.* v. 23, n. 1, p. 139-143, 2008.

Moridi, I. et al. Bone marrow stem cell chemotactic activity is induced by elevated CXCL12 in endometriosis. *Reprod. Sci.* v. 24, n. 4, p. 526-533, 2017.

Nácul, A.; Spritzer, P. Current aspects on diagnosis and treatment of endometriosis. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* v. 32, n. 6, p. 298-307.

Nombela-Arrieta, C et al. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* v. 12, n. 2, p. 126-131, 2011.

Ojosnegros, S. et al. Embryo implantation in the laboratory: an update on current techniques. *Hum. Reprod.* v. 27, n. 3, p. 501-530, 2021.

Pittenger, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

Pluchino, N.; Taylor, H.S. Endometriosis and stem cell trafficking. *Reprod. Sci.* v. 23, n. 12, p. 1616-1619, 2016.

Rosa-e-Silva, A.C.J.S. et al. Uterine administration of CXCL12 increases pregnancy rates in mice with induced endometriosis. *F&S Science*. 2022.

Rosa-e-Silva, A.C.J.S. et al. Dose-dependent decreased fertility in response to the burden of endometriosis in a murine model. *Reprod. Sci.* 2019.

Sakr, S. et al. Endometriosis impairs bone marrow-derived stem cell recruitment to the uterus whereas bazedoxifene treatment leads to endometriosis regression and improved uterine stem cell engraftment. *Endocrinology*. v. 155, n. 4, p. 1489-1497, 2014.

Sampson, J.A. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am. J. Pathol.* v. 3, n. 2, p. 93-110, 1927.

Senapati, S.; Barnhart, K. Managing endometriosis associated infertility. *Clin. Obstet. Gynecol.* v. 54, n. 4, p. 720-726, 2011.

Stilley, J.A. et al. Cellular and molecular basis for endometriosis-associated infertility. *Cell Tissue Res.* v. 349, n. 3, p. 849-862, 2012.

Sung, J.H. et al. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplant. Proc.* v. 40, n. 8, p. 2649-2654, 2008.

Tal, R. et al. A murine 5-fluorouracil-based submyeloablation model for the study of bone marrow-derived cell trafficking in reproduction. *Endocrinology*. v. 157, n. 10, p. 3749-3759, 2016.

Taylor, H.S. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA*, v. 292, n. 1, p. 81-85, 2004.

Tomassetti, C.; D'Hooghe, T. Endometriosis and infertility: insights into the causal link and management strategies. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet.* v. 51, p. 25-33, 2018.

Wang, X. et al. Chemoattraction of bone marrow-derived stem cells towards human endometrial stromal cells is mediated by estradiol regulated CXCL12 and CXCR4 expression. *Stem Cell Res.* v. 15, n. 1, p. 14-22, 2015.

Wang, Y. et al. The origin and pathogenesis of endometriosis. *Annu. Rev. Pathol.* v. 15, p. 71-95, 2020.

Wei, Q.M.A. et al. Reduced expression of biomarkers associated with the implantation window in women with endometriosis. *Fertil. Steril.* v. 91, n. 5, p. 1686-1691, 2009.

Zanatta, A. et al. The role of the Hoxa10 gene in the etiology of the endometriosis and its related infertility: a review. *J. Assist. Reprod. Genet.* v. 27, n. 12, p. 701-710, 2010.

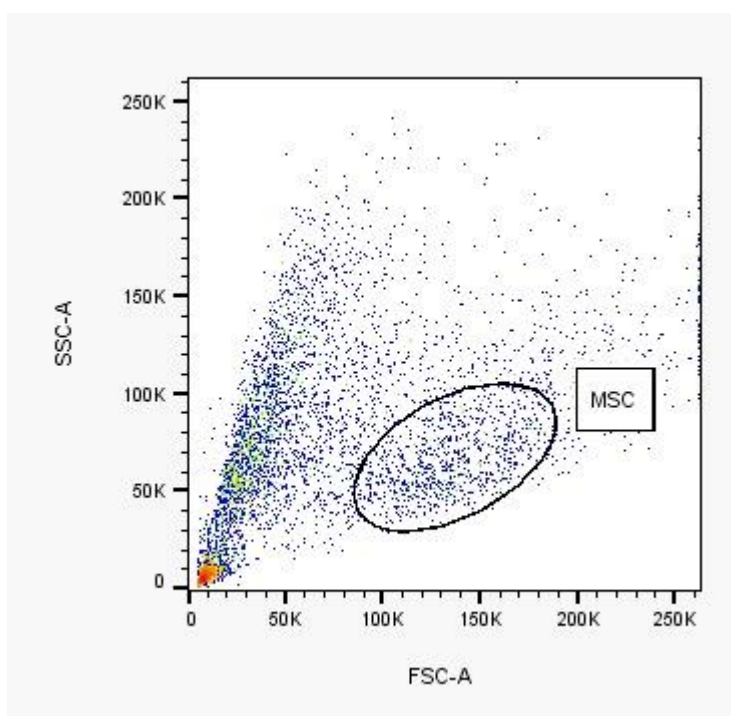
Zhao, J. et al. Uterine infusion with bone marrow mesenchymal stem cells improves endometrium thickness in a rat model of thin endometrium. *Reprod. Sci.* v. 22, n. 2, p. 181-188, 2015.

Zhao, Y. Using mesenchymal stem cells to treat female infertility: an update on female reproductive diseases. *Stem Cells Int.* 2019.

Zhu, H. et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nature*, v. 5, n. 3, p. 550-560. 2010.

ANEXOS

ANEXO A – Representação da população de Células Estromais Mesenquimais por citometria de fluxo



Nota: Foram obtidos um total de 5 mil eventos e para as análises dos marcadores de superfície celular (SCA-1, CD11b, CD34, CD31 e CD45) foram eliminados os debris e células mortas.

Anexo B - Aprovação para execução do projeto pelo CEUA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CEUA
FMRP-USP
Comissão de Ética no Uso de Animais
Replacement/Reduction/Refinement

AUTORIZAÇÃO

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: *“Efeito da administração Intrauterina de CXCL12 sobre a migração de células tronco derivadas da medula óssea (BMDSCs) para o endométrio tóxico de camundongos subfêrteis com endometriose”*, registrado com o número de protocolo **224/2019**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 16 de dezembro de 2019.

Colaboradores: Prof. Dr. Julio Cesar Rosa e Silva
Aline Gonçalves Sawa

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade			<input type="checkbox"/> Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização			16/12/2019 a 01/03/2023	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / C57Bl/6	105	20g / 45 dias	Fêmea	Serviço de Biotério
Camundongo / GFP	40	20g / 45 dias	Macho	Centro de Criação de Camundongos Especiais

Ribeirão Preto, 16 de dezembro de 2019

Profa. Dra. Katuchia Uzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP