UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FERNANDO PASSADOR VALÉRIO

Influência da doxiciclina em endometriose experimentalmente induzida em ratas

Ribeirão Preto
2018

FERNANDO PASSADOR VALÉRIO

Influência da doxiciclina em endometriose experimentalmente induzida em ratas

Versão Original

Dissertação apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Tocoginecologia

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Rosa e Silva

Ribeirão Preto

2018

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.

Valério, Fernando Passador.

Influência da doxiciclina em endometriose experimentalmente induzida em ratas. / Fernando Passador Valério; orientador Júlio César Rosa e Silva. Ribeirão Preto, 2018.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, 2018.

1.Endometriose. 2.Metaloproteinase. 3.Invasão Tecidual. 4.TIMP. 5.Doxiciclina. 6. Ratas

Nome: VALÉRIO, Fernando Passador

Título: Influência da doxiciclina em endometriose experimentalmente induzida em ratas.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Mestre em Tocoginecologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

Aos meus pais **Fátima e João Marcos (*in memoriam*)**, pelos primeiros e mais importantes ensinamentos, e todas as oportunidades e amor que me proporcionam desde o meu nascimento.

À **Paola**, esposa amada, amor da minha vida, companheira em todas as horas, apoio incondicional a todos os meus sonhos.

Ao meu irmão **Maurício** e sua cônjuge **Mariana,** pela torcida, mesmo à distância, e carinho que mutuamente nos fortalece.

Agradecimento especial

Ao meu orientador Prof. Dr. **Júlio César Rosa e Silva**, grande professor e amigo, que me ensinou muito do que sei, e que acreditou em mim quando tudo parecia não funcionar e muitos não acreditaram. Também, pela compreensão, paciência e principalmente por poder contar com sua amizade.

Agradecimentos

A toda minha família que sempre me apoiou e manifestou palavras de ânimo.

Ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMUSP- Ribeirão Preto que permitiu realizar e concluir este projeto

À Comissão de Pós-graduação em Tocoginecologia pelo apoio e incentivo em tantas ocasiões e a todos que compõe o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Ribeirão Preto, pelo contínuo aprendizado, indispensável à minha formação profissional.

Aos funcionários Sr. Reinaldo Tavares, Sra. Rosane Casula, Gabriela Francisco Sicca e Suelen Soares, incansáveis colaboradores de minha jornada.

Aos Professores Drs. Omero Benedicto Poli-Neto, Antônio Alberto Nogueira, Pedro Sergio Magnani e Dra. Juliana Meola pelos inestimáveis conselhos, correções e co-orientações.

Às amigas Cristiana Carolina Padovan e Laura Midori Kawasse, indispensáveis aos passos técnicos, e principalmente pela amizade que tornaram a caminhada mais amena e prazerosa.

A todos os funcionários do Setor de Cirurgia Experimental do Hospital, José Carlos Vanni, Paulo Alves Junior, Paulo Castilho, Danniely da Silva Barros, Wagner Andrade de Oliveira, Daniel Mazetto e Ariane Mirela Saranzo Sant'Ana, por todos incontáveis momentos que me auxiliaram e se dedicaram para a conclusão do meu projeto.

Aos amigos do Setor de Vídeo-endoscopia Ginecológica do Departamento em especial os grandes colegas Dra. Ana Carolina Tagliatti Zani, Dra. Júlia K. Troncon e Dr. Rodrigo Hudari Garcia, pela alegria que tem sido conviver com vocês, dentro e fora do trabalho.

Ao grande amigo Dr. José Vitor Cabral Zanardi, parceiro, sócio e grande professor, que sem seus ensinamentos não teria conseguido chegar onde cheguei profissionalmente.

Ao chefe do Departamento de Patologia Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Prof. Dr. Alfredo Ribeiro da Silva, pelo apoio, incentivo e conhecimento repassados.

Aos roedores, animais do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto que participaram deste estudo pela inestimável serventia.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

VALÉRIO, F. P. Influência da doxiciclina em endometriose experimentalmente induzida em ratas. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2018.

Resumo

A endometriose é uma doença de origem multifatorial, caracterizada por presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina, responsável por sintomas álgicos com grande impacto na qualidade de vida da paciente, além de ser um dos principais fatores de infertilidade. Muitos estudos já foram realizados no intuito de explicar a etiopatogenia da endometriose, assim como muito tem sido estudado para encontrar novas estratégias de tratamento. Várias linhas de medicamentos têm sido estudadas com este intuito, agindo em diferentes pontos da etiopatogênese da doença, uma delas na inibição de metaloproteinases da matriz extracelular, que tem papel no remodelamento do mesotélio do peritônio e angiogênese. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de uma droga (doxiciclina) de baixo custo, com ação conhecida na inibição das metaloproteinases, em endometriose peritoneal induzida em ratas. Para isso, foram usadas 30 ratas adultas Wistar com lesão induzida de endometriose, divididas em três grupos, um grupo controle (C, n=10) sem tratamento, um grupo onde foi administrado doxiciclina em baixa dose (BD, n=10) e um grupo onde foi realizado doxiciclina em alta dose (AD, n=10). Foi realizada avaliação da área das lesões de cada rata e estudo imunohistoquímico para positividade de anticorpo primário de metaloproteinase de matriz 9 (MMP9) e de inibidor de metaloproteinase de matriz 2 (TIMP2). A doxiciclina atuou reduzindo a área das lesões nos grupos BD e AD (p=0,0052) em relação ao grupo C e reduzindo a expressão do TIMP2 no grupo AD (p=0,0009) em relação aos grupos BD e C. Não houve resultado significativo na expressão da MMP9.

Palavras-chave: Endometriose. Doxiciclina. MMP. TIMP. Metaloproteinase. Invasão Tecidual. Ratas. Matriz extracelular.

VALÉRIO, F. P. Influence of doxycycline in experimentally induced endometriosis in rats. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2018.

Abstract

Endometriosis is a multifactorial origin disease, characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity, responsible for painful symptoms with important impact on the life quality of the patient, besides being one of the main factors of infertility. Many studies have already been carried out to explain the etiopathogenesis of endometriosis, and much has been studied to find new treatment strategies. Several lines of drugs have been studied for this purpose, acting at different points in the etiopathogenesis of the disease, one of them in the inhibition of extracellular matrix metalloproteinases, which plays a role in the remodeling of the peritoneum mesothelium and angiogenesis. The purpose of this study was to evaluate the influence of a low-cost drug (doxycycline), with known action on the inhibition of metalloproteinases, in induced peritoneal endometriosis in rats. Thirty adult Wistar rats with endometriosis-induced lesions were divided into three groups: one untreated control group (C, n = 10), one group receiving low dose doxycycline (BD, n = 10) and a group where high dose doxycycline (AD, n = 10) was performed. An evaluation of the lesion area of each rat and immunohistochemical study for primary antibody to matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and matrix metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP2) was performed. Doxycycline worked by reducing the area of lesions in the BD and AD groups ($p = 0.0052$) in relation to the C group and reducing the expression of TIMP2 in the AD group ($p = 0.0009$) in relation to the BD and C groups. There was no significant effect on MMP9 expression in the present study.

Key words: Endometriosis. Doxycycline. MMP. TIMP. Metalloproteinase. Tissue Invasion. Rats. Extracellular matrix.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Distribuição das variáveis de peso em relação aos grupos **26**

Tabela 2: Área final das lesões nos diferentes grupos **28**

Tabela 3: Avaliação da positividade para MMP9 na imunohistoquímica das lesões entre os diferentes grupos **28**

Tabela 4: Avaliação da positividade para TIMP2 na imunohistoquímica das lesões entre os diferentes grupos **30**

Lista de Figuras

Figura 1: Aspecto macroscópico das lesões peritoneais no momento da segunda abordagem cirúrgica..... **27**

Figura 2: Aferição das medidas após excisão das lesões..... **27**

Figura 3: Exemplo de reação positiva ao MMP9 no Grupo Controle (Microscopia, aumento 20x)..... **28**

Figura 4: Exemplo de reação negativa ao MMP9 no Grupo Baixa Dose (Microscopia, aumento 20x)..... **29**

Figuras 5 e 6: Exemplos de reação ao MMP9 positiva (à esquerda) e negativa (à direita) no Grupo Alta Dose (Microscopia, aumento 20x)..... **29**

Figuras 7 e 8: Exemplos de reação ao TIMP2 positiva (à esquerda) e negativa (à direita) no Grupo Controle (Microscopia, aumento 20x) **30**

Figura 9: Exemplo de reação positiva ao TIMP2 no Grupo Baixa Dose (Microscopia, aumento 20x)..... **31**

Figura 10: Exemplo de reação negativa ao TIMP2 no Grupo Alta Dose (Microscopia, aumento 20x)..... **31**

Lista de Abreviaturas

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AD	Grupo Alta Dose
BD	Grupo Baixa Dose
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina e Eosina
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase de Matriz
MMP9	Metaloproteinase de Matriz 9
MMPs	Metaloproteinases
PBS	Tampão de solução salina
PCNA	Antígeno nuclear celular proliferativo
pH	Potencial hidrogênio
TBST	Tris buffered saline e Polissorbato 20
TIMPs	Inibidor tecidual de metaloproteinases de matriz
TIMP2	Inibidor tecidual de metaloproteinase 2
USP	Universidade de São Paulo
UK	United Kingdom
Zn	Zinco

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
g	gramas
cm	centímetros
mm^2	milímetros quadrados
ºC	graus Celsius
®	Marca Registrada
ml	mililitro
mg	miligrama
kg	quilograma
µl	microlitro

SUMÁRIO

1. Introdução…….……..... 16
2. Justificativa..……..……..... 20
3. Objetivos.....……..…….. 21
3.1 Objetivo geral..... 21
3.2 Objetivos específicos…….....……...….. 21
4. Metodologia….....……..……... 22
4.1 Animais e Procedimentos para Modelo experimental ……..... 22
4.1.1 Técnica de indução das lesões de endometriose..……...……..... 22
4.1.2 Obtenção das lesões para análise histológica e molecular..... 23
4.2 Processamento do material para Coloração e Imunohistoquímica..... 23
4.3 Análise estatística.....……..……..... 24
5 Resultados.....……..…..……..... 26
5.1 Do preparo e coleta do material.....……..……..…… 26
5.2 Da avaliação macroscópica das lesões..... 26
5.3 Da avaliação histopatológica e imunohistoquímica..... 28
6. Discussão……..……..….... 32
7. Conclusões.....…… 35
Referências bibliográficas……..…..... 36
Anexo..... 43

1. Introdução

Endometriose é uma doença caracterizada pela presença de tecido endometrial funcionante (glândula e/ou estroma) fora da cavidade uterina. As lesões são usualmente localizadas na pelve, porém podem ocorrer em múltiplas localidades como intestino, diafragma, cavidade pleural entre outras (VERCELLINI et al., 2014). Sua prevalência varia de 5 a 15% das mulheres no período reprodutivo, em torno de 3% na pós-menopausa, enquanto que nas mulheres inférteis pode oscilar entre 20 a 50% (BALLARD et al., 2008). Em uma proporção significativa de mulheres portadoras de endometriose, entre 3 a 22%, observa-se que elas são assintomáticas. Mas, na maioria das vezes, apresentam sintomas diversos, sendo os principais dismenorreia, dor pélvica crônica, infertilidade, dispareunia de profundidade e sintomas intestinais e urinários cíclicos, como dor ou sangramento ao evacuar ou urinar durante o período menstrual (VIGANÒ et al., 2004; BELLELIS et al., 2010).

Várias teorias tentam explicar a etiopatogenia da endometriose, já que a mesma é multifatorial, incluindo implantação de tecido endometrial pela menstruação retrógrada via tuba uterina, alteração de imunidade, descontrole do balanço entre apoptose e proliferação celular, sinalização endocrinológica alterada e fatores genéticos (SAMPSON, 1927; RAHMIOGLU et al., 2014). Vários novos estudos com foco na identificação de genes relacionados a endometriose não malignas evidenciaram mutações em genes associados a neoplasias em até 79% das lesões endometrióticas (ANGLESIO et al., 2017).

Se levarmos em consideração que a menstruação retrógrada ocorre em 76 a 90% das mulheres que menstruam, incidência maior que a da própria endometriose, a teoria da menstruação retrógrada não é suficiente para explicá-la. Embora o mecanismo exato pelo qual o refluxo do endométrio menstrual para implantação ectópica permaneça desconhecida, adesão, invasão e o desenvolvimento da doença exigem um aumento da expressão de metaloproteinases de matriz (MMP), levando a remodelação da camada de mesotélio peritoneal e angiogênese (SILLEM et al., 1998; BRUNER-TRAN et al., 2002; OSTEEN et al., 2002; SHARPE-TIMMS; COX, 2002).

As metaloproteinases são uma família de endoproteases dependentes de cálcio e zinco, que estão envolvidas na degradação da matriz extracelular e membrana basal. Elas influenciam o resultado de reações inflamatórias, angiogênese e tecido de remodelação, por conseguinte, mediam uma grande variedade de processos biológicos normais, incluindo desenvolvimento embrionário, ovulação, menstruação e cicatrização de feridas (MOTT; WERB, 2004). Eles também estão implicados em vários processos patológicos tais como cancro, aterosclerose, doenças inflamatórias ou endometriose (MEDURI; BAUSERO; PERROT-APPLANAT, 2000; NELSON et al., 2000). A ligação entre a expressão das metaloproteinases e etiopatologia da endometriose tem sido amplamente estudada, (CHUNG et al., 2001; COX; PIVA; SHARPE-TIMMS, 2001; LIU; HE; PENG, 2002; RIA et al., 2002; WU et al., 2005). As MMPs estão envolvidas na implantação ectópica e invasão dos tecidos endometriais pois facilitam a degradação da matriz extracelular e ajudam na penetração da membrana basal. Como um membro importante da família MMPs, a metaloproteinase do tipo IX (MMP-9) é um tipo de enzima gelatinase que participa da degradação do colágeno do tipo III, IV e V, além da elastina. Também exerce funções importantes na facilitação da neo-angiogênese, que acelera a expansão seletiva das células endoteliais vasculares e aumenta o fluxo sanguíneo, beneficiando assim o crescimento invasivo do endométrio ectópico (YU et al., 2008; LIU et al., 2015).

Supressão e a regulação negativa da expressão das MMPs inibem o estabelecimento de lesões ectópicas do endométrio humano em experimentos com ratos (BRUNER-TRAN et al., 2002, 2006). As MMPs são reguladas em múltiplos níveis, incluindo transcrição, secreção, ativação das formas zimogênicas, inibição extracelular e internalização por endocitose. A atividade de MMP é modulada positivamente por íons e reagentes que induzem sua clivagem e ativação. Os quelantes de Zn^{2+} reprimem a atividade de MMP privando-os do Zn^{2+} crítico para sua atividade (NEWSOME et al., 2007). As MMPs também são inibidas por inibidores endógenos e exógenos. Os inibidores de tecidos das metaloproteinases (TIMPs) são os principais reguladores endógenos das MMPs e consistem em quatro membros homólogos (TIMP1-4; 6, 7, 8). Os TIMPs são proteínas multifuncionais que inibem a invasão celular in vitro, oncogênese e metástase in vivo (GOMEZ et al., 1997). Embora cada TIMP pareça capaz de inibir várias MMPs, essas proteínas exibem

capacidade de inibição preferencial; por exemplo, TIMPs1 e 2 inibem seletivamente MMP9 e 2, respectivamente (BAKER; AHONEN; KÄHÄRI, 2002).

Outras teses para a manifestação do tecido endometriótico, como origem imunológica e metaplasia celômica, tem sido estudado para explicar o aparecimento de endometriose em mulheres pré-puberes e homens, bem como em locais como cavidade pleural e meninge. O surgimento de lesões de endometriose no espaço retroperitoneal, vagina, colo do útero, cicatriz umbilical e pleura pode ser explicado pela disseminação linfática e hematogênica de células endometriais (SUGINAMI, 1991; CHUNG et al., 2002; DING et al., 2002; WITZ et al., 2002).

Na investigação de endometriose, o padrão ouro ainda para o diagnóstico se baseia na laparoscopia com visualização direta das lesões com confirmação histológica. O tratamento cirúrgico tem a intenção principal de aumentar as taxas de fertilidade e reduzir a dor. Para tanto, é necessário remover todas as lesões visíveis e restaurar a anatomia pélvica, o que torna a laparoscopia um procedimento diagnóstico e terapêutico (BULLETINS--GYNECOLOGY, 2010).

Basear todo o tratamento da endometriose na cirurgia nem sempre é adequado, pois a endometriose apresenta várias aparências e nem sempre é possível identificá-las todas, além de aumentar o risco de morbimortalidade para a paciente (HOWARD, 2011). É nesse ponto que se faz necessária a associação de medicamentos que reduzam o crescimento das lesões, bem como o aparecimento de novas e tragam melhora dos sintomas apresentados clinicamente (PETTA et al., 2009).

As medicações mais usadas para tratamento clínico incluem analgésicos não esteroidais, contraceptivos hormonais, agonistas do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) e inibidores de aromatase. Como ainda não há consenso na literatura sobre eficácia de um método sobre outro, a escolha da medicação é baseada na severidade dos sintomas, preferência da paciente, efeitos secundários, resposta terapêutica, necessidade de contracepção, custo e viabilidade (DUNSELMAN et al., 2014).

Como pode haver importante recidiva dos sintomas (STREULI et al., 2013) e até 25% das pacientes terão efeitos secundários intoleráveis, ou resposta clínica insuficiente (VERCELLINI et al., 2009), novas opções terapêuticas necessitam ser descobertas. A realização de estudos em endometriose que visem a comprovar a eficácia medicamentosa necessita de métodos invasivos, o que restringe estudos

com humanos e torna fundamental o uso de um bom modelo animal (ROSA-E-SILVA et al., 2010).

Coelhos, ratos e camundongos tem se mostrado bons modelos para tais estudos (VERNON; WILSON, 1985; SHARPE-TIMMS, 2002), sendo vastamente utilizado o modelo em roedores, proposto por Jones (JONES, 1987). Por apresentar técnica cirúrgica simples, tem altas taxas de sucesso na indução da endometriose e é altamente reprodutível (SCHOR et al., 1999).

A fim de testar novas medicações no tratamento da endometriose, usando modelo animais, e conhecendo o papel da MMP na patogenia da endometriose, procuramos inibidores exógenos da via de ação da MMP. A doxiciclina, que pertence à família das tetraciclinas quimicamente modificadas, é uma droga com ação celular pluripotente, incluindo a proliferação, a migração, a apoptose e a remodelação da matriz extracelular (BENDECK et al., 2002; LEE et al., 2006). Ela e outros derivados de tetraciclina, são potentes inibidores não-específicos de metaloproteinases (GOLUB et al., 2001; ACHARYA et al., 2004; CHOI et al., 2004; LEE et al., 2004a, 2004b). Em adição aos efeitos inibidores sobre as metaloproteinases, a doxiciclina tem outras propriedades não antibióticas que são: anti-angiogênicos, anti-inflamatória e anti-apoptótica (SAPADIN; FLEISCHMAJER, 2006).

2. Justificativa

A patogênese da endometriose envolve aumento da expressão de metaloproteinases de matriz, que por sua vez facilita a degradação e invasão tecidual, por isso drogas que inibam essa expressão devem ter um efeito sobre as lesões experimentalmente induzidas de endometriose.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Comparar em um estudo exploratório o efeito da doxiciclina sobre as lesões endometrióticas induzidas em ratas.

3.2 Objetivo especifico

Avaliar a influência da doxiciclina sobre lesões de endometriose através de análise objetiva do tamanho final das lesões e da análise de marcadores de remodelamento de matriz extracelular e invasão tecidual (MMP9 – *matrix metallopeptidase 9* e TIMP2 – *metallopeptidase inhibitor 2*) por imunohistoquímica.

4. Metodologia

O estudo, de caráter exploratório, foi realizado nos Departamentos de Ginecologia e Obstetrícia e de Patologia e Medicina Legal e no Setor de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão preto da Universidade de São Paulo e foi aprovado no Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) desta Instituição. (Anexo 1)

4.1 Animais e Procedimentos para Modelo experimental

Foram utilizadas 30 ratas Wistar virgens, com aproximadamente 190g no início do experimento, provenientes do Serviço de Biotério do Campus Universitário de Ribeirão Preto. Primeiramente, para aclimatação antes do início do experimento, as ratas foram mantidas em gaiolas apropriadas, com 41x32 centímetros de perímetro e 17 cm de altura, com no máximo 4 animais por gaiola, sob controle de temperatura, umidade e luminosidade do ambiente por sete dias e alimentadas com água e ração Purina® para ratos a livre demanda. Após esse período, todas as ratas foram submetidas a laparotomia para indução da lesão de endometriose experimental.

4.1.1 Técnica de indução das lesões de endometriose

Primeiramente foi realizado indução anestésica usando injeção intraperitoneal com 0,3ml de cloridrato de quetamina 10% (Ketamina Agener, União Química Farmacêutica Nacional AS, Uso veterinário) associado a 0,2ml de xilasina a 2mg/ml (Dopaser, Hertape Calier). A seguir, foram procedidos a tricotomia pélvica, os cuidados de antissepsia e a lavagem das luvas de látex com soro fisiológico para reduzir a formação de aderências. A abertura da cavidade pélvica foi realizada através de incisão longitudinal mediana de cerca de dois centímetros, a dois centímetros do púbis do roedor. Aberta a cavidade, foram ressecados quatro centímetros do corno uterino direito, sendo o coto fechado na sequência. A porção uterina dissecada, após imersão em soro fisiológico 0,9% a 4˚C por 2 minutos, foi incisada longitudinalmente para retirada de dois fragmentos de 5x5 milímetros.

Esses fragmentos de tecido endometrial foram suturados no peritônio próximo ao trato reprodutivo da rata, usando o fio Vicryl 6-0 (Ethicon, Inc., New Jersey, EUA), com a face endometrial voltada para a cavidade pélvica, um fragmento à direita e o outro à esquerda. Posteriormente, a cavidade pélvica foi fechada com sutura contínua da musculatura e da pele usando Nylon 4-0 (Mononylon 3-0, Ethicon, Inc. New Jersey, EUA). Todos os procedimentos descritos acima foram realizados pelo mesmo pesquisador e nenhuma suplementação hormonal foi administrada antes ou após a laparotomia. Foi utilizada como droga analgésica pós-operatório dipirona na dose de 100mg/kg por sete dias (ABBOTT; HELLEMANS, 2000).

4.1.2 Obtenção das lesões para análise macroscópica e imunohistoquímica

Após 4 semanas do primeiro procedimento cirúrgico (NOVELLA-MAESTRE et al., 2009), as ratas foram alocadas em três grupos de 10 animais cada: um grupo controle (grupo Controle), em que foi utilizada soro fisiológico intraperitoneal diariamente por 28 dias, um grupo que recebeu a droga doxiciclina em baixa dose intraperitoneal (5mg/kg/dia) diariamente por 28 dias (grupo Baixa Dose) e um terceiro grupo que recebeu a droga doxiciclina em alta dose intraperitoneal (40mg/kg/dia) diariamente por 28 dias (grupo Alta Dose) (PRALL et al., 2002; LEE et al., 2006).

Após as quatro semanas de tratamento, as ratas foram submetidas à eutanásia através da sobredosagem de anestésicos (xilasina + quetamina), no dobro da dose utilizada anteriormente para a anestesia, e foi realizada a inspeção da cavidade abdomino-pélvica, com identificação e documentação das lesões, sendo medida as lesões nos dois maiores diâmetros e documentada através de fotografia macroscópica das lesões.

4.2 Processamento do material para Coloração e imunohistoquímica

As lesões de endometriose foram excisadas para análise, depois fixadas em formol 10% para processamento para inclusão em parafina e coloração por hematoxilina e eosina (HE) para documentação e percepção da presença ou não de tecido endometrial e reação de imunohistoquímica. Foram realizados cortes histológicos de 4µm em cada lesão de endometriose, e divididos em 2 grupos.

Para o preparo da imunohistoquímica foi utilizado o kit Revel (Biogen): os cortes foram desparafinizados em xileno e hidratados em uma série de álcoois em ordem decrescente e água destilada. Em seguida, foram submetidos à recuperação antigênica com tampão de citrato (pH 6,0) em panela a vapor por 40 minutos e, logo após, as amostras foram resfriadas por 30 minutos em temperatura ambiente.

Após o resfriamento, os cortes foram lavados em PBS para bloqueio da peroxidase endógena por 15 minutos, em TBST por 5 minutos e foi realizado o bloqueio da proteína com Protein Block por 10 minutos.

Então, o primeiro grupo de amostras foi incubado no anticorpo primário MMP9(NCL-MMP9-439, diluição 1:100, fabricante Leica Biosystem) e o segundo grupo de foi incubado no anticorpo primário TIMP2(Rabbit Ant-Human Timp-2 Polyclonal Antibody, diluição 1:150, fabricante Gspring Bioscience) por 1 hora em temperatura ambiente. O processo para preparo das lâminas após foi o seguinte: lavagem em TBST por 1 minuto, aplicação de Revel Complemento por 10 minutos, aspiração, aplicação de HRP conjugado por 15 minutos, lavagem em TBST por 5 minutos, aplicação de DAB (3,3 diaminobenzina) por 105 segundos, lavagem em água destilada. A coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris e azulada em amônia a 5%. Foi realizada a desidratação na ordem crescente de álcoois e xilol, com montagem das lâminas com Entellan (Merck).

As lâminas foram analisadas por dois examinadores independentes. As células foram marcadas positiva ou negativamente, para cada marcador, segundo critérios utilizados na literatura(WEIGEL et al., 2012). Considerando-se como positivos os casos com mais de 10% de células marcadas.

4.3 Análise estatística

Inicialmente foi realizada uma análise exploratória de dados através de medidas de posição central e de dispersão para as variáveis quantitativas. As variáveis qualitativas foram descritas através de frequências absolutas e relativas.

O teste qui-quadrado foi utilizado para verificar se existe associação dos marcadores em relação aos grupos em estudo. Uma análise de variância foi desempenhada para verificar se existe diferença estatística dos grupos em relação as variáveis quantitativas, contrastes ortogonais foram aplicados quando necessário. O ajuste do modelo foi verificado considerando a análise de resíduos. As análises

foram implementadas no programa SAS versão 9.4. Foi considerado um nível de significância de teste de 5%.

5. Resultados

5.1. Do preparo e coleta do material

A média do peso inicial das ratas do grupo Controle foi de 201,4g, das ratas do grupo Baixa Dose (BD) foi 192,5g e das ratas do grupo Alta Dose(AD) foi 194,0g. Ao final do experimento, ou seja, no dia da eutanásia e da exérese das lesões, a média de pesos entre os grupos era de: 374g (Controle), 364,2g (BD) e 370,0g (AD). Assim, calculamos o ganho de peso de cada rata, desde o início ao final do experimento, com a diferença entre as médias obtidas (Δ PESO), e analisamos que não houve diferença estatística entre elas. (Tabela 1)

Tabela 1. Distribuição das variáveis de peso em relação aos grupos.

	Grupo	N	Média	DP	Mediana	Q1	Q3	Mínimo	Máximo	P-valor
PESO INICIAL	AD	10	194	11,93	189	186	204	180	214	
	BD	10	192,5	10,21	191	184	196	180	215	
	Controle	10	201,4	15,46	202	190	204	180	232	
PESO FINAL	AD	10	370	23,66	364	358	394	328	404	
	BD	10	364,2	33,43	359	340	371	326	436	
	Controle	10	374	55,22	361	334	398	300	466	
Δ PESO	AD	10	176	16,14	174	164	190	148	200	
	BD	10	171,7	25,5	172	148	180	146	221	0,9461
	Controle	10	172,6	43,26	164	136	202	120	240	

P-valor referente à análise de variância.

5.2. Da avaliação macroscópica das lesões

Após a coleta das lesões, foram documentadas (Figura 1 e 2) e anotadas as duas maiores medidas das lesões e calculadas suas áreas, evidenciando diferença estatística entre os grupos Alta Dose(AD) e Baixa Dose(BD) quando comparados ao grupo Controle (tabela 2).

Figura 1. Aspecto macroscópico das lesões peritoneais no momento da segunda abordagem cirúrgica

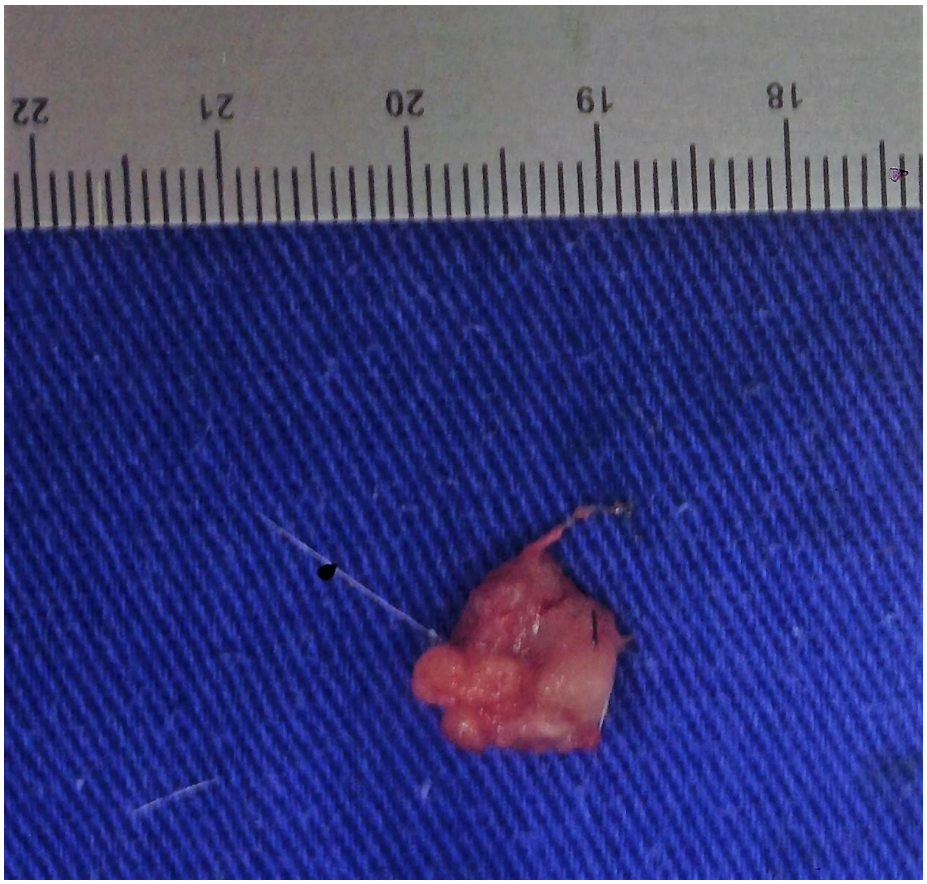


Figura 2. Aferição das medidas após excisão das lesões

Tabela 2. Área final das lesões nos diferentes grupos.

	Grupo	N	Média	DP	Mediana	Q1	Q3	Mínimo	Máximo	P-valor
ÁREA DA LESÃO (mm^2)	AD**	10	29	11,98	30	20	36	12	48	
	BD**	10	74,1	45,89	60	36	120	25	150	0,0052
	Controle*	10	161,1	137,07	110	72	225	20	400	

P-valor referente a análise de variância.

5.3. Da avaliação histopatológica e imunohistoquímica

A imunohistoquímica para MMP9 nas lesões endometrióticas evidenciou uma diminuição na positividade quanto maior fosse a dose, porém sem significância estatística (p=0,2713). (tabela 3)

Tabela 3. Avaliação da positividade para MMP9 na imunohistoquímica das lesões entre os diferentes grupos.

	Grupos			
Variável	**Alta Dose**	**Baixa Dose**	**Controle**	**P-valor***
MMP9				
NEGATIVO	4 (40)	2 (20)	1 (10)	0,2713
POSITIVO	6 (60)	8 (80)	9 (90)	

P-valor referente ao teste qui-quadrado.

No Grupo Controle, nove ratas apresentaram positividade para MMP9 no tecido endometriótico e apenas uma rata apresentou negatividade (Figura 3).

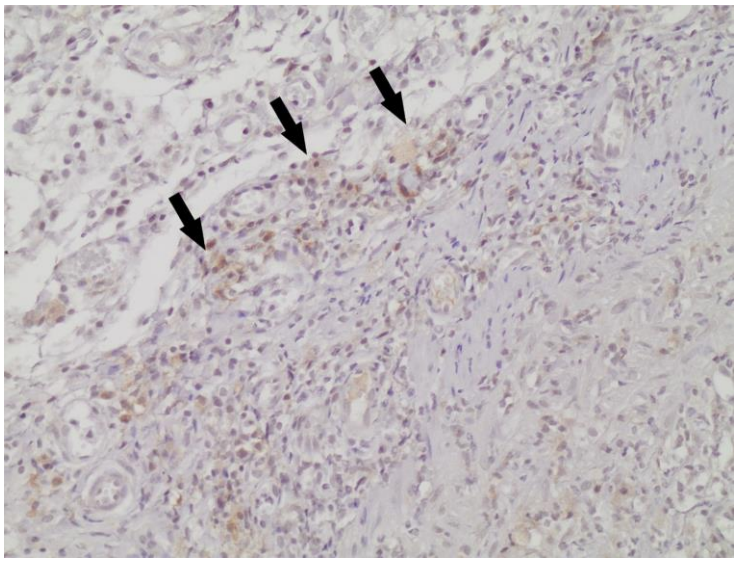


Figura 3. Exemplo de reação positiva ao MMP9 em rata do Grupo Controle (Microscopia, aumento 20x)

No Grupo Baixa Dose, oito ratas apresentaram lesões com reação positiva e duas ratas com lesões negativas (Figura 4).

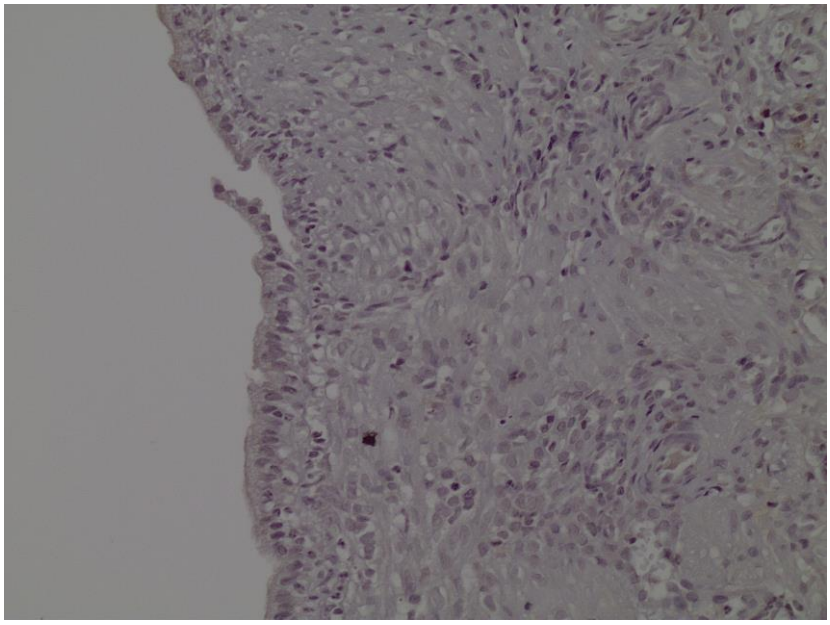
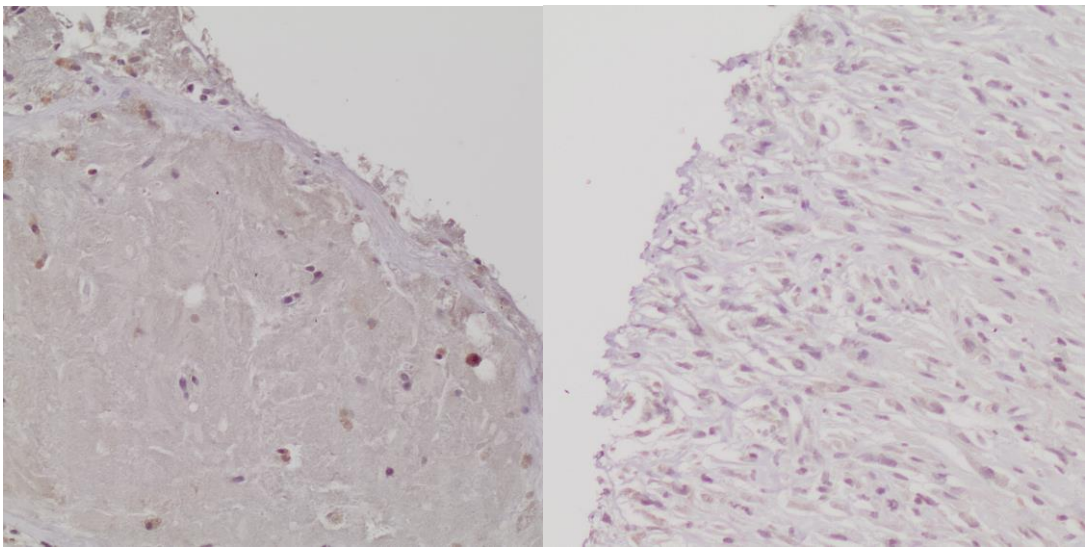


Figura 4. Exemplo de reação negativa ao MMP9 em rata do Grupo Baixa Dose (Microscopia, aumento 20x)

Por fim, no grupo de Alta Dose, seis ratas apresentaram positividade e quatro ratas negatividade (Figuras 5 e 6).



Figuras 5 e 6. Exemplos de reação ao MMP9 positiva (à esquerda) e negativa (à direita) no Grupo Alta Dose (Microscopia, aumento 20x)

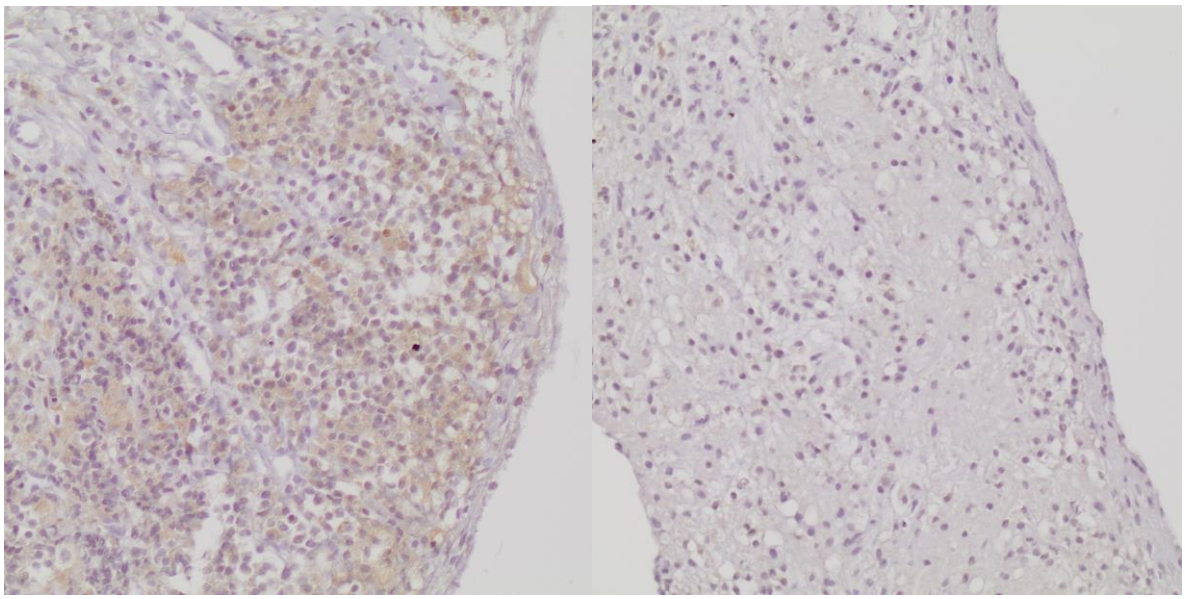
Já na imunohistoquímica para TIMP-2 nas lesões endometrióticas induzidas das ratas, o grupo Alta Dose evidenciou significância estatística (p=0,0009) na diminuição de reação positiva quando comparada aos grupos Baixa Dose e Controle. (tabela 4)

Tabela 4. Avaliação da positividade para TIMP2 na imunohistoquímica das lesões entre os diferentes grupos.

	Grupos			
Variável	**Alta Dose**	**Baixa Dose**	**Controle**	**P-valor***
TIMP2				
NEGATIVO	9 (90)	1 (10)	3 (30)	0,0009
POSITIVO	1 (10)	9 (90)	7 (70)	

P-valor referente ao teste qui-quadrado.

No Grupo Controle, três ratas apresentaram negatividade para TIMP2 no tecido endometriótico e sete apresentaram positividade (Figuras 7 e 8).



Figuras 7 e 8. Exemplos de reação ao TIMP2 positiva (à esquerda) e negativa (à direita) no Grupo Controle (Microscopia, aumento 20x)

No Grupo Baixa Dose, nove ratas apresentaram lesões com reação positiva e apenas uma rata com lesão negativa (Figura 9).

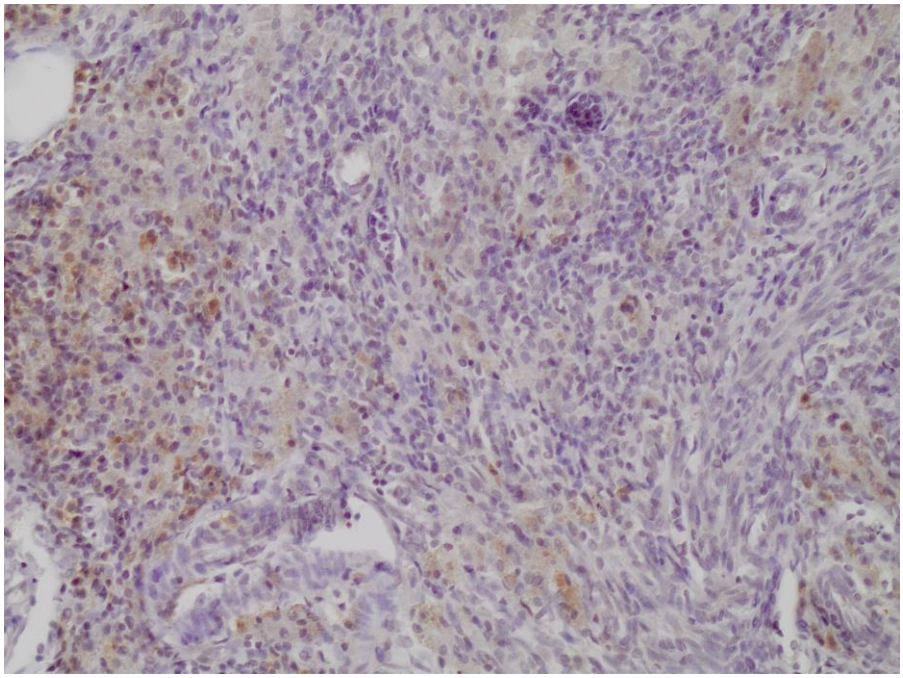


Figura 9. Exemplo de reação positiva ao TIMP2 em rata do Grupo Baixa Dose (Microscopia, aumento 20x)

Por fim, no grupo de Alta Dose, apenas uma rata apresentou positividade enquanto nove ratas negatividade (Figura 10).

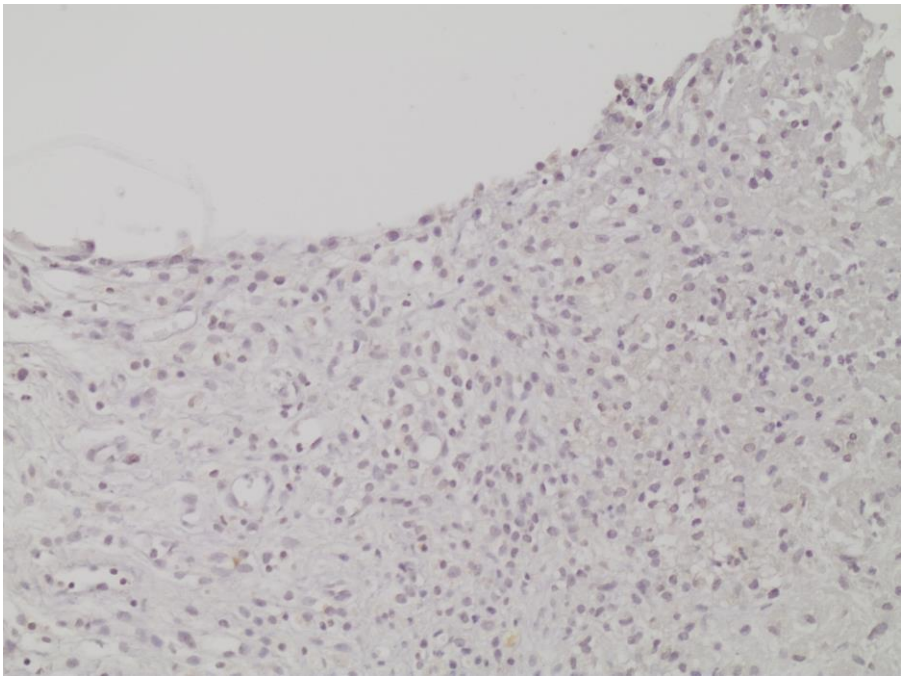


Figura 10. Exemplo de reação negativa ao TIMP2 em rata do Grupo Alta Dose (Microscopia, aumento 20x)

6. Discussão

O processo de formação do tecido endometrial ectópico pode ser mediado por fatores que facilitam a adesão à cavidade peritoneal, fatores de crescimento celular, maior atividade da aromatase, fatores angiogênicos, linfáticos, neurogênicos e a atividade ampliada das metaloproteinases da matriz (MMPs) (KONINCKX; KENNEDY; BARLOW, 1998; VAN LANGENDONCKT; CASANAS-ROUX; DONNEZ, 2002). Para que a adesão celular e a infiltração ocorram, o tecido deve primeiro sofrer modificações estruturais, como a destruição e remodelação da matriz extracelular. Esta ação proteolítica ocorre através da ação de 2 proteases, como as serinas e as MMP(GUPTA et al., 2008).

A família das MMP consiste em 23 enzimas divididas nos seguintes subgrupos: colagenases (MMP1, MM8 e MMP13), gelatinases (MMP2 e MMP9), estromelisinas (MMP3, MMP10, e MMP11), e metaloproteinases de membrana (MT-MMPs), entre outras (NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006). Sendo que as mais importantes no processo etiopatogênico da endometriose são MMP2 e MMP9.

A MMP9 está relacionada na decomposição da matriz extracelular em processos fisiológicos normais, como reprodução, desenvolvimento embrionário, remodelação de tecidos, e em processos patológicos, como artrite, metástases e a própria endometriose. A MMP9, assim como outras MMPs, tem demonstrado ser um fator importante na progressão e invasão de tumores de endométrio (GRAESSLIN et al., 2006). O mecanismo patogênico da endometriose inclui, além de proliferação e invasão tecidual, a degradação da matriz extracelular com facilitação na penetração da camada basal pelas células endometriais. Já tendo sido demonstrado níveis elevados de MMP9 no líquido peritoneal e no plasma em pacientes com endometriose (LIU et al., 2015). Os níveis elevados de MMP, incluindo a MMP9, foram observados no endométrio ectópico em comparação com o endométrio eutópico. Além disso, as mulheres sem endometriose apresentam níveis mais baixos de expressão dessas substâncias (DI CARLO et al., 2009). Alguns estudos observaram que a falta de expressão da atividade de MMP está relacionada a menos lesões ectópicas em ratos (BRUNER et al., 1997). Consequentemente, a

atividade de enzimas que degradam a matriz extracelular pode facilitar a invasão da superfície peritoneal pelo tecido.

As MMPs estão sob controle de inibidores de tecidos específicos de metaloproteinases (TIMPs) no nível pós-tradução. No entanto, os TIMPs não são simplesmente inibidores da atividade proteolítica; eles também têm papéis multifuncionais, incluindo crescimento celular, angiogênese e apoptose (LAMBERT et al., 2004). Mulheres com endometriose possuem uma expressão diferente de MMP9 e TIMP2 no endométrio tópico e ectópico, sendo que baixos níveis de TIMP2 no fluído peritoneal levam a um aumento na MMP9 e tal desequilíbrio favorece a degradação da matriz extracelular e a invasão tecidual, promovendo a implantação de tecido endometrial ectópico (LONDERO et al., 2012).

O uso de inibidores de metaloproteinases sintéticos (MMPI) vem sendo estudado como opção terapêutica para o tratamento da endometriose. A doxiciclina além da sua função antibiótica, possui propriedades anti-MMP bem reconhecidas que não estão bem definidas, agindo principalmente através da inibição da síntese e da atividade das MMP (HANEMAAIJER et al., 1998; THOMPSON; BAXTER, 1999; SAPADIN; FLEISCHMAJER, 2006). Sendo assim, a doxiciclina tem sido utilizada em alguns estudos clínicos e pré-clínicos para modular a atividade de MMP.

Nesse estudo, o uso da doxiciclina apresentou redução, com significância estatística, da área das lesões endometrióticas (p=0,0052) nos grupos de alta e de baixa dose quando comparados ao grupo controle, sugerindo assim que inibidores de metaloproteinases sintéticos possam estar correlacionados a inibição do crescimento da lesão. Na literatura, Akkaya et al. e Goktolga et al. (AKKAYA et al., 2009; GOKTOLGA et al., 2015) demonstraram, com significância estatística, diminuição do tamanho dos implantes endometrióticos quando usado doxiciclina em baixa dose (5mg/kg/dia) e doxiciclina em alta dose (40mg/kg/dia) em relação a um grupo controle, apesar de terem um viés de não usar medicação nenhuma no grupo controle, não causando o efeito de stress de administração medicamentosa, e como é sabido, a endometriose por ter etiologia multifatorial, o stress está relacionado a aumento de lesões endometrióticas em estudos animais (CUEVAS et al., 2012).

No estudo imunohistoquímico, observou-se uma diminuição na expressão proteica da MMP9 nos grupos de alta e baixa dose de doxiciclina em relação ao grupo controle, porém sem significância estatística. Nos únicos dois estudos que usaram doxiciclina para observar seu efeitos sobre lesões endometrióticas, a MM9

também não teve diminuição quando comparadas ao grupo controle (AKKAYA et al., 2009; GOKTOLGA et al., 2015).

Já quando foi mensurado a expressão proteica do TIMP2, o grupo de ratas que foi administrado doxiciclina em alta dose teve forte diminuição na quantificação (p=0,0009) em relação aos grupos que usaram doxiciclina baixa dose e controle. Mesmo sabendo que o TIMP2 está em baixas doses no fluído de pacientes com endometriose (LONDERO et al., 2012), o presente estudo mostrou que quando usado doxiciclina em alta dose, o TIMP2 tende a diminuir mais, o que já foi evidenciado em outros estudos, como de Singh et al. que demonstrou diminuição da TIMP2 após uso da doxiciclina em tecido gástrico (SINGH et al., 2011) e com Bian et al. que evidenciou o mesmo em córnea de olhos secos (BIAN et al., 2016). Porém outros estudos demonstraram o contrário, tendo aumento da expressão da TIMP2 quando usado doxiciclina em tecido arterial (CHUNG et al., 2008; NAGAREDDY et al., 2012).

Com relação a proporção TIMP/MMP, a literatura mostra resultados conflitantes quando relacionados a doenças neoplásicas com invasão tecidual. A maior parte dos estudos mostrou que quanto maior o grau de invasão tecidual ou gravidade do tumor, maior é a expressão dos TIMPs e das MMPs, e o inverso também é verdadeiro, mostrando que quando as MMPs vêm diminuídas, é seguida da expressão baixa dos TIMPs, como no presente estudo quando se usou doxiciclina no grupo Alta Dose com diminuição do tamanho da lesão em relação ao grupo Controle. Isso demonstra que grande parte do nexo causal está relacionada ao desequilíbrio entre os fatores que moldam a matriz extracelular, ambos aumentando ou diminuindo concomitantes em alguns casos, apesar de se pensar que seria o contrário (ROSS et al., 2003; HONKAVUORI-TOIVOLA et al., 2013).

A pesquisa experimental é uma forma de se obter conclusões causais, com relação a intervenções ou tratamentos, e estabelecer se um ou mais fatores causam uma mudança em um resultado. Por meio desta associando análises imunohistoquímicas e avaliação macroscópica foi possível analisar a resposta das lesões experimentalmente induzidas perante o uso da doxiciclina.

7. Conclusões

No presente estudo da ação da doxiciclina nas lesões endometrióticas experimentalmente induzidas em ratas, observamos que:

a) Houve redução significativa da área das lesões entre os grupos, sugerindo que a doxiciclina tenha um efeito positivo no controle da doença;
b) A avaliação da expressão proteica de MMP nas lesões demonstra uma tendência a redução para os grupos que usaram a medicação quando comparados ao grupo controle;
c) A quantificação de TIMP2 foi significativamente menor no grupo Alta Dose quando comparado aos outros dois grupos, concluindo que talvez a doxiciclina possa agir como feedback negativo na produção da TIMP2, seja ela por ter efeito anti-MMP diminuindo assim a necessidade de expressão endógena do mesmo, ou por outros fatores ainda não descobertos.

Esses achados permitem concluir que inibidores da metaloproteinases sintéticos sejam opções reais para o tratamento da endometriose, com grandes perspectivas de ação seletiva na lesão, sem prejuízo da função reprodutiva da paciente. Sendo assim, a doxiciclina por ser uma medicação desta classe já liberada no mercado, de baixo custo, bom perfil de tolerabilidade e fácil administração, seria uma nova frente no tratamento clinico para pacientes com endometriose. Porém mais estudos adicionais deverão ser realizados para analisar sua eficácia como adjunto na terapia para endometriose.

Referências Bibliográficas

ABBOTT, F. V.; HELLEMANS, K. G. C. Phenacetin, acetaminophen and dipyrone: Analgesic and rewarding effects. **Behavioural Brain Research**, v. 112, n. 1–2, p. 177–186, 2000.

ACHARYA, M. R.; VENITZ, J.; FIGG, W. D.; SPARREBOOM, A. **Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinasesDrug Resistance Updates**, 2004. .

AKKAYA, P.; ONALAN, G.; HABERAL, N.; BAYRAKTAR, N.; MÜLAYIM, B.; ZEYNELOGLU, H. B. Doxycycline causes regression of endometriotic implants: a rat model. **Human Reproduction**, v. 24, n. 8, p. 1900–1908, 1 ago. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dep106>.

ANGLESIO, M. S.; PAPADOPOULOS, N.; AYHAN, A.; NAZERAN, T. M.; NOË, M.; HORLINGS, H. M.; LUM, A.; JONES, S.; SENZ, J.; SECKIN, T.; HO, J.; WU, R.-C.; LAC, V.; OGAWA, H.; TESSIER-CLOUTIER, B.; ALHASSAN, R.; WANG, A.; WANG, Y.; COHEN, J. D.; WONG, F.; HASANOVIC, A.; ORR, N.; ZHANG, M.; POPOLI, M.; MCMAHON, W.; WOOD, L. D.; MATTOX, A.; ALLAIRE, C.; SEGARS, J.; WILLIAMS, C.; TOMASETTI, C.; BOYD, N.; KINZLER, K. W.; GILKS, C. B.; DIAZ, L.; WANG, T.-L.; VOGELSTEIN, B.; YONG, P. J.; HUNTSMAN, D. G.; SHIH, I.-M. Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 19, p. 1835–1848, 2017. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1614814>.

BAKER, A. H.; AHONEN, M.; KÄHÄRI, V.-M. Potential Applications of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) Overexpression For Cancer Gene Therapy BT - Cancer Gene Therapy: Past Achievements and Future Challenges. In: HABIB, N. A. (Ed.). Boston, MA: Springer US, 2002. p. 469–483.

BALLARD, K. D.; SEAMAN, H. E.; DE VRIES, C. S.; WRIGHT, J. T. Can symptomatology help in the diagnosis of endometriosis? Findings from a national case-control study - Part 1. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 115, n. 11, p. 1382–1391, 2008.

BELLELIS, P.; DIAS JR, J. A.; PODGAEC, S.; GONZALES, M.; BARACAT, E. C.; ABRÃO, M. S. Aspectos epidemiológicos e clínicos da endometriose pélvica: uma série de casos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 4, p. 467–471, 2010.

BENDECK, M. P.; CONTE, M.; ZHANG, M.; NILI, N.; STRAUSS, B. H.; FARWELL, S. M. Doxycycline Modulates Smooth Muscle Cell Growth, Migration, and Matrix Remodeling after Arterial Injury. **The American Journal of Pathology**, v. 160, n. 3, p. 1089–1095, 2002. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010649292>.

BIAN, F.; PELEGRINO, F. S. A.; HENRIKSSON, J. T.; PFLUGFELDER, S. C.;

VOLPE, E. A.; LI, D.-Q.; DE PAIVA, C. S. Differential Effects of Dexamethasone and Doxycycline on Inflammation and MMP Production in Murine Alkali-Burned Corneas Associated with Dry Eye. **The Ocular Surface**, v. 14, n. 2, p. 242–254, 2016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542012416000021>.

BRUNER-TRAN, K. L.; EISENBERG, E.; YEAMAN, G. R.; ANDERSON, T. A.; MCBEAN, J.; OSTEEN, K. G. Steroid and cytokine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 10, p. 4782–4791, 2002.

BRUNER-TRAN, K. L.; ZHANG, Z.; EISENBERG, E.; WINNEKER, R. C.; OSTEEN, K. G. Down-Regulation of Endometrial Matrix Metalloproteinase-3 and -7 Expression in Vitro and Therapeutic Regression of Experimental Endometriosis in Vivo by a Novel Nonsteroidal Progesterone Receptor Agonist, Tanaproget. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 4, p. 1554–1560, 1 abr. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2005-2024>.

BRUNER, K. L.; MATRISIAN, L. M.; RODGERS, W. H.; GORSTEIN, F.; OSTEEN, K. G. Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 12, p. 2851–2857, 1997.

BULLETINS--GYNECOLOGY, A. C. O. P. **Practice bulletin no. 114: Management of endometriosisObstetrics and Gynecology**, 2010. .

CHOI, D. H.; MOON, I. S.; CHOI, B. K.; PAIK, J. W.; KIM, Y. S.; CHOI, S. H.; KIM, C. K. Effects of sub-antimicrobial dose doxycycline therapy on crevicular fluid MMP-8, and gingival tissue MMP-9, TIMP-1 and IL-6 levels in chronic periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 39, n. 1, p. 20–26, 2004.

CHUNG, A. W. Y.; YANG, H. H. C.; RADOMSKI, M. W.; VAN BREEMEN, C. Long-Term Doxycycline Is More Effective Than Atenolol to Prevent Thoracic Aortic Aneurysm in Marfan Syndrome Through the Inhibition of Matrix Metalloproteinase-2 and -9. **Circulation Research**, v. 102, n. 8, p. e73 LP-e85, 25 abr. 2008. Disponível em: <http://circres.ahajournals.org/content/102/8/e73.abstract>.

CHUNG, H. W.; LEE, J. Y.; MOON, H. S.; HUR, S. E.; PARK, M. H.; WEN, Y.; POLAN, M. L. Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium. In: Fertility and Sterility, 4, **Anais**...2002.

CHUNG, H. W.; WEN, Y.; CHUN, S. H.; NEZHAT, C.; WOO, B. H.; LAKE POLAN, M. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: A rationale for endometriotic invasiveness. **Fertility and Sterility**, v. 75, n. 1, p. 152–159, 2001.

COX, K. E.; PIVA, M.; SHARPE-TIMMS, K. L. Differential regulation of matrix metalloproteinase-3 gene expression in endometriotic lesions compared with endometrium. **Biology of reproduction**, v. 65, p. 1297–1303, 2001.

CUEVAS, M.; FLORES, I.; THOMPSON, K. J.; RAMOS-ORTOLAZA, D. L.;

TORRES-REVERON, A.; APPLEYARD, C. B. Stress exacerbates endometriosis manifestations and inflammatory parameters in an animal model. **Reproductive Sciences**, v. 19, n. 8, p. 851–862, 2012.

DI CARLO, C.; BONIFACIO, M.; TOMMASELLI, G. A.; BIFULCO, G.; GUERRA, G.; NAPPI, C. Metalloproteinases, vascular endothelial growth factor, and angiopoietin 1 and 2 in eutopic and ectopic endometrium. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 6, p. 2315–2323, 2009.

DING, J.; SHEN, J.; RANA, N.; FERNANDEZ, B. B.; DMOWSKI, W. P. Relationship between apoptosis and the number of macrophages in eutopic endometrium from women with and without endometriosis. In: Fertility and Sterility, 4, **Anais**...2002.

DUNSELMAN, G. A. J.; VERMEULEN, N.; BECKER, C.; CALHAZ-JORGE, C.; D'HOOGHE, T.; DE BIE, B.; HEIKINHEIMO, O.; HORNE, A. W.; KIESEL, L.; NAP, A.; PRENTICE, A.; SARIDOGAN, E.; SORIANO, D.; NELEN, W. ESHRE guideline: Management of women with endometriosis. **Human Reproduction**, v. 29, n. 3, p. 400–412, 2014.

GOKTOLGA, U.; CAVKAYTAR, S.; ALTINBAS, S. K.; TAPISIZ, O. L.; TAPISIZ, A.; ERDEM, O. Effect of the non-specific matrix metalloproteinase inhibitor Doxycycline on endometriotic implants in an experimental rat model. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 9, n. 5, p. 1813–1818, 2015.

GOLUB, L. M.; MCNAMARA, T. F.; RYAN, M. E.; KOHUT, B.; BLIEDEN, T.; PAYONK, G.; SIPOS, T.; BARON, H. J. Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis. **Journal of clinical periodontology**, v. 28, n. 2, p. 146–56, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11168739>.

GOMEZ, D. E.; ALONSO, D. F.; YOSHIJI, H.; THORGEIRSSON, U. P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. **European journal of cell biology**, v. 74, n. 2, p. 111–22, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9352216>.

GRAESSLIN, O.; CORTEZ, A.; UZAN, C.; BIREMBAUT, P.; QUEREUX, C.; DARAÏ, E. Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expressions. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 16, n. 5, p. 1911–1917, 2006.

GUPTA, S.; GOLDBERG, J. M.; AZIZ, N.; GOLDBERG, E.; KRAJCIR, N.; AGARWAL, A. **Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertilityFertility and Sterility**, 2008. .

HANEMAAIJER, R.; VISSER, H.; KOOLWIJK, P.; SORSA, T.; SALO, T.; GOLUB, L. M.; HINSBERGH, V. W. M. Van. Inhibition of MMP Synthesis by Doxycycline and Chemically Modified Tetracyclines (CMTs) in Human Endothelial Cells. **Advances in Dental Research**, v. 12, n. 1, p. 114–118, 1998. Disponível em: <http://adr.sagepub.com/content/12/1/114%5Cnhttp://adr.sagepub.com/content/12/1/114.short>.

HONKAVUORI-TOIVOLA, M.; SANTALA, M.; SOINI, Y.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T.; TALVENSAARI-MATTILA, A. Combination of Strong MMP-2 and

Weak TIMP-2 Immunostainings Is a Significant Prognostic Factor in Endometrial Carcinoma. **Disease markers**, v. 35, n. 4, p. 261–266, 11 set. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3810671/>.

HOWARD, F. M. **Surgical Treatment of EndometriosisObstetrics and Gynecology Clinics of North America**, 2011. .

JONES, R. C. The effect of a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist on experimental endometriosis in the rat. **Acta endocrinologica**, v. 114, n. 3, p. 379–382, 1987.

KONINCKX, P. R.; KENNEDY, S. H.; BARLOW, D. H. Endometriotic disease: The role of peritoneal fluid. In: Human Reproduction Update, 5, **Anais**...1998.

LAMBERT, E.; DASSÉ, E.; HAYE, B.; PETITFRÈRE, E. **TIMPs as multifacial proteinsCritical Reviews in Oncology/Hematology**, 2004. .

LEE, C. Z.; YAO, J. S.; HUANG, Y.; ZHAI, W.; LIU, W.; GUGLIELMO, B. J.; LIN, E.; YANG, G. Y.; YOUNG, W. L. Dose-response effect of tetracyclines on cerebral matrix metalloproteinase-9 after vascular endothelial growth factor hyperstimulation. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 26, n. 9, p. 1157–1164, 2006.

LEE, H.-M.; CIANCIO, S. G.; TÜTER, G.; RYAN, M. E.; KOMAROFF, E.; GOLUB, L. M. Subantimicrobial Dose Doxycycline Efficacy as a Matrix Metalloproteinase Inhibitor in Chronic Periodontitis Patients Is Enhanced When Combined With a Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 3, p. 453–463, 2004a. Disponível em: <http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2004.75.3.453>.

LEE, K. S.; JIN, S. M.; KIM, S. S.; LEE, Y. C. Doxycycline reduces airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 5, p. 902–909, 2004b.

LIU, H.; WANG, J.; WANG, H.; TANG, N.; LI, Y.; ZHANG, Y.; HAO, T. Correlation between matrix metalloproteinase-9 and endometriosis. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 10, p. 13399–13404, 2015.

LIU, X.-J.; HE, Y.-L.; PENG, D.-X. Expression of metalloproteinase-9 in ectopic endometrium in women with endometriosis. **Di 1 jun yi da xue xue bao = Academic journal of the first medical college of PLA**, v. 22, n. 5, p. 467–9, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12390721>.

LONDERO, A. P.; CALCAGNO, A.; GRASSI, T.; MARZINOTTO, S.; ORSARIA, M.; BELTRAMI, C. A.; MARCHESONI, D.; MARIUZZI, L. Survivin, MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2: Their impact on survival, implantation, and proliferation of endometriotic tissues. **Virchows Archiv**, v. 461, n. 5, p. 589–599, 2012.

MEDURI, G.; BAUSERO, P.; PERROT-APPLANAT, M. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the human endometrium: modulation during the menstrual cycle. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 2, p. 439–47, 2000.

MOTT, J. D.; WERB, Z. **Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinasesCurrent Opinion in Cell Biology**, 2004. .

NAGAREDDY, P. R.; RAJPUT, P. S.; VASUDEVAN, H.; MCCLURE, B.; KUMAR, U.; MACLEOD, K. M.; MCNEILL, J. H. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 improves endothelial function and prevents hypertension in insulin-resistant rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 3, p. 705–715, 1 fev. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3315042/>.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. **Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPsCardiovascular Research**, 2006. .

NELSON, A. R.; FINGLETON, B.; ROTHENBERG, M. L.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: Biologic activity and clinical implications. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 5, p. 1135–1149, 2000.

NEWSOME, A. L.; JOHNSON, J. P.; SEIPELT, R. L.; THOMPSON, M. W. Apolactoferrin inhibits the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2 by zinc chelation. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 85, n. 5, p. 563–572, 20 set. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/O07-073>.

NOVELLA-MAESTRE, E.; CARDA, C.; NOGUERA, I.; RUIZ-SAURÍ, A.; GARCÍA-VELASCO, J. A.; SIMÓN, C.; PELLICER, A. Dopamine agonist administration causes a reduction in endometrial implants through modulation of angiogenesis in experimentally induced endometriosis. **Human Reproduction**, v. 24, n. 5, p. 1025–1035, 2009.

OSTEEN, K. G.; BRUNER-TRAN, K. L.; KELLER, N. R.; EISENBERG, E. Progesterone-mediated endometrial maturation limits matrix metalloproteinase (MMP) expression in an inflammatory-like environment: a regulatory system altered in endometriosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 955, p. 37-47–8, 396–406, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11949963>.

PETTA, C. A.; FERRIANI, R. A.; ABR??O, M. S.; HASSAN, D.; ROSA E SILVA, J. C.; PODGAEC, S.; BAHAMONDES, L. **A 3-year follow-up of women with endometriosis and pelvic pain users of the levonorgestrel-releasing intrauterine systemEuropean Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, 2009. .

PRALL, A. K.; LONGO, G. M.; MAYHAN, W. G.; WALTKE, E. A.; FLECKTEN, B.; THOMPSON, R. W.; BAXTER, B. T. Doxycycline in patients with abdominal aortic aneurysms and in mice: Comparison of serum levels and effect on aneurysm growth in mice. **Journal of Vascular Surgery**, v. 35, n. 5, p. 923–928, 2002.

RAHMIOGLU, N.; NYHOLT, D. R.; MORRIS, A. P.; MISSMER, S. A.; MONTGOMERY, G. W.; ZONDERVAN, K. T. **Genetic variants underlying risk of endometriosis: Insights from meta-analysis of eight genome-wide association and replication datasetsHuman Reproduction Update**, 2014. .

RIA, R.; LOVERRO, G.; VACCA, A.; RIBATTI, D.; CORMIO, G.; ROCCARO, A. M.; SELVAGGI, L. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 agree with progression of ovarian endometriomas. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, n. 3, p. 199–206, 1 mar. 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2362.2002.00960.x>.

ROSA-E-SILVA, J. C.; GARCIA, S. B.; DE SÁ ROSA-E-SILVA, A. C. J.; CANDIDO-

DOS-REIS, F. J.; POLI-NETO, O. B.; FERRIANI, R. A.; NOGUEIRA, A. A. Increased cell proliferation in experimentally induced endometriosis in rabbits. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 5, p. 1637–1642, 2010.

ROSS, J. S.; KAUR, P.; SHEEHAN, C. E.; FISHER, H. A. G.; KAUFMAN JR, R. A.; KALLAKURY, B. V. S. Prognostic Significance of Matrix Metalloproteinase 2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 Expression in Prostate Cancer. **Modern Pathology**, v. 16, p. 198, 1 mar. 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/01.MP.0000056984.62360.6C>.

SAMPSON, J. A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 14, n. 4, p. 422–469, 1927. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000293781530003X>.

SAPADIN, A. N.; FLEISCHMAJER, R. Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 2, p. 258–265, 2006.

SCHOR, E.; BARACAT, E. C.; SIMÕES, M. J.; DE FREITAS, V.; GIANNOTTI FILHO, O.; RODRIGUES DE LIMA, G. Effects of conjugated estrogens and progestogen in surgically induced endometriosis in oophorectomized rats. **Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology**, v. 26, n. 3–4, p. 158–161, 1999.

SHARPE-TIMMS, K. L. Using rats as a research model for the study of endometriosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 955, p. 318-27–2, 396–406, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11949958>.

SHARPE-TIMMS, K. L.; COX, K. E. Paracrine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 955, p. 147-56–8, 396–406, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11949944>.

SILLEM, M.; PRIFTI, S.; NEHER, M.; RUNNEBAUM, B. Extracellular matrix remodelling in the endometrium and its possible relevance to the pathogenesis of endometriosis. In: Human Reproduction Update, 5, **Anais**...1998.

SINGH, L. P.; MISHRA, A.; SAHA, D.; SWARNAKAR, S. Doxycycline blocks gastric ulcer by regulating matrix metalloproteinase-2 activity and oxidative stress. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 28, p. 3310–3321, 2011.

STREULI, I.; DE ZIEGLER, D.; SANTULLI, P.; MARCELLIN, L.; BORGHESE, B.; BATTEUX, F.; CHAPRON, C. An update on the pharmacological management of endometriosis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 3, p. 291–305, 2013. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14656566.2013.767334>.

SUGINAMI, H. A reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 165, n. 1, p. 214–218, 1991.

THOMPSON, R. W.; BAXTER, B. T. MMP inhibition in abdominal aortic aneurysms. Rationale for a prospective randomized clinical trial. **Annals of the New York**

Academy of Sciences, v. 878, p. 159–78, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415728>.

VAN LANGENDONCKT, A.; CASANAS-ROUX, F.; DONNEZ, J. **Oxidative stress and peritoneal endometriosisFertility and Sterility**, 2002. .

VERCELLINI, P.; SOMIGLIANA, E.; VIGAN, P.; ABBIATI, A.; BARBARA, G.; CROSIGNANI, P. G. **Surgery for endometriosis-associated infertility: A pragmatic approachHuman Reproduction**, 2009. .

VERCELLINI, P.; VIGANÒ, P.; SOMIGLIANA, E.; FEDELE, L. Endometriosis: Pathogenesis and treatment. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 5, p. 261–275, 2014.

VERNON, M. W.; WILSON, E. A. **Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat.Fertility and sterility**, 1985. .

VIGANÒ, P.; PARAZZINI, F.; SOMIGLIANA, E.; VERCELLINI, P. **Endometriosis: Epidemiology and aetiological factorsBest Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, 2004. .

WEIGEL, M. T.; KRÄMER, J.; SCHEM, C.; WENNERS, A.; ALKATOUT, I.; JONAT, W.; MAASS, N.; MUNDHENKE, C. Differential expression of MMP-2, MMP-9 and PCNA in endometriosis and endometrial carcinoma. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 160, n. 1, p. 74–78, 2012.

WITZ, C. A.; CHO, S.; MONTOYA-RODRIGUEZ, I. A.; SCHENKEN, R. S. The (2) e (3) integrins do not mediate attachment of endometrial cells to peritoneal mesothelium. In: Fertility and Sterility, 4, **Anais**...2002.

WU, M.-H.; SHOJI, Y.; WU, M.-C.; CHUANG, P.-C.; LIN, C.-C.; HUANG, M.-F.; TSAI, S.-J. Suppression of Matrix Metalloproteinase-9 by Prostaglandin E2 in Peritoneal Macrophage Is Associated with Severity of Endometriosis. **The American Journal of Pathology**, v. 167, n. 4, p. 1061–1069, 2005. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010611959>.

YU, J.; WANG, Y.; ZHOU, W. H.; WANG, L.; HE, Y. Y.; LI, D. J. Combination of estrogen and dioxin is involved in the pathogenesis of endometriosis by promoting chemokine secretion and invasion of endometrial stromal cells. **Human Reproduction**, v. 23, n. 7, p. 1614–1626, 2008.

Anexo

Anexo 1. Aprovação do comitê de ética em experimentação animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3315-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação **nº 203/2014**, sobre o projeto intitulado *"Influência da doxiciclina em endometriose experimentalmente induzida em ratas"*, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Oméro Benedicto Poli Nétto** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 29 de junho de 2015.

We certify that the protocol ***nº 203/2014***, entitled ***"Influence of doxycycline in experimentally induced endometriosis in rats"***, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in ***06/29/2015.***

Ribeirão Preto, 29 de junho de 2015.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP - USP